

Aus der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und
Geburtshilfe der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Sven Mahner

**Repositionierung von Disulfiram zur Therapie des
Ovarialkarzinoms**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Margarita Maria Papaioannou

aus

München

Jahr

2017

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Sven Mahner
Mitberichterstatter:	Priv.-Doz. Dr. med. Beyhan Ataseven Prof. Dr. Peter Graf zu Eulenburg
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. rer. nat. Ansgar Brüning
Dekan:	Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel
Tag der mündlichen Prüfung:	19.01.2017

Meinem Vater Herrn Dipl.-Ing. Haralambos Papaioannou (†)

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	8
1.1	Medikamentenrepositionierung.....	8
1.1.1	Grundzüge der Arzneimittelentwicklung.....	8
1.1.2	Begriffsklärung Medikamentenrepositionierung	9
1.1.3	Beispiele Medikamentenrepositionierung	10
1.1.4	Medikamentenrepositionierung in der Krebstherapie	13
1.2	Ovarialkarzinom	13
1.2.1	Epidemiologie.....	13
1.2.2	Ätiologie und Risikofaktoren.....	14
1.2.3	Symptome und Diagnostik.....	15
1.2.4	Therapiemöglichkeiten und Prognose	16
1.3	Disulfiram.....	17
1.3.1	Therapie der Alkoholabhängigkeit.....	17
1.3.2	Pharmakologische Eigenschaften	17
1.3.3	Medikamentenrepositionierung.....	18
1.3.4	Antitumorale Eigenschaften.....	19
1.4	Hitzeschockproteine	19
1.4.1	Funktion.....	19
1.4.2	Hitzeschockprotein 70 mit Ko-Chaperon HSP40 und HSPA4.....	20
1.4.3	Hitzeschockfaktor 1.....	22
1.4.4	Ubiquitin und Ko-Chaperon CHIP	24
1.4.5	Hitzeschockprotein 90.....	24
1.4.6	Hitzeschockprotein 27.....	25
1.5	Endoplasmatisches Retikulum.....	26
1.5.1	BIP	26
1.5.2	CHOP.....	27
1.5.3	C-Jun N-terminale Kinasen.....	27
1.6	Das Thioredoxinsystem.....	29
1.7	Fragestellung	30
2	Material und Methoden	31
2.1	Geräte und Software	31
2.2	Verbrauchsmaterialien	31

2.3	Chemikalien und Biochemikalien.....	32
2.3.1	Proteinchemische Reagenzien	32
2.3.2	Molekularbiologische Reagenzien:.....	33
2.3.3	Medikamente/Substanzen.....	33
2.4	Zellkultur und Zelllinien	34
2.4.1	Bildung von Zelllysaten.....	35
2.4.2	Zellfraktionierung.....	36
2.4.3	Clonal Assay.....	38
2.5	Immunblotanalyse.....	38
2.5.1	Gelelektrophorese	38
2.5.2	Immunblotting.....	39
2.5.3	Verwendete Antikörper.....	41
2.6	Polymerase-Kettenreaktion	43
2.6.1	RNA-Isolation.....	43
2.6.2	C-DNA - Synthese	44
2.6.3	Real-Time-PCR.....	45
2.6.4	Standard-PCR.....	46
2.6.5	Theoretischer Ablauf PCR	47
2.6.6	Agarose-Gelelektrophorese	49
2.6.7	Verwendete Primer.....	50
2.7	Immunfluoreszenzanalyse.....	51
2.7.1	Methodik.....	51
2.7.2	Verwendete Antikörper.....	51
2.8	MTT-Test	52
3	Ergebnisse.....	53
3.1	Analyse der zytotoxischen Eigenschaften verschiedener Substanzen auf Ovarialkarzinomzellen	53
3.2	Der zytotoxische Effekt von Disulfiram in Abhängigkeit von Kupfer	55
3.2.1	Apoptose-Induktion und Hitzeschockreaktion der Zelle nach der Behandlung mit Disulfiram und Kupfer	57
3.2.2	ER-Stress und Akkumulation von polyubiquitinierten Proteinen durch die Kombinationstherapie.....	60
3.2.3	Transkriptionelle Induktion von Hitzeschockproteinen durch Disulfiram und Kupfer als frühes Ereignis.....	61
3.2.4	Einfluss von Disulfiram/Kupfer auf die subzelluläre Verteilung von HSP 27 und HSF1 ..	64
3.2.5	Einfluss von Disulfiram/Kupfer auf die Stabilität des Zytoskeletts.....	70

3.2.6	Einfluss von Disulfiram/Kupfer auf das langfristige Zellüberleben.....	72
3.3	Verstärkung des zytotoxischen Effekts von Disulfiram/Kupfer durch Auranofin	74
3.4	Einfluss der Kombinationstherapien auf Mammakarzinomzellen.....	76
3.4.1	Einfluss von Disulfiram/Kupfer	76
3.4.2	Einfluss von Auranofin.....	78
4	Diskussion.....	80
4.1	Disulfiram.....	80
4.1.1	Wirkungsweise.....	80
4.1.2	Disulfiram als Proteasom-Inhibitor.....	81
4.1.3	NF-κB Inhibition durch Disulfiram.....	83
4.1.4	Hitzeschockinduktion durch Disulfiram/Kupfer	84
4.1.5	Aktivierung des Hitzeschockfaktors 1	85
4.1.6	Induktion von ER-Stress durch Disulfiram/Kupfer.....	88
4.1.7	Erhöhte Wirksamkeit von Disulfiram in der Kombination mit Kupfer	90
4.2	Verstärkung der zytotoxischen Wirkung von Disulfiram/Kupfer durch Auranofin.....	92
4.3	Wirkung der Kombinationstherapien auf Mammakarzinomzellen	93
4.3.1	Disulfiram/Kupfer	93
4.3.2	Auranofin	94
4.4	Medikamentenrepositionierung.....	95
4.5	Ausblick.....	96
5	Zusammenfassung.....	98
6	Literaturverzeichnis	99
7	Abkürzungsverzeichnis.....	133
8	Abbildungsverzeichnis.....	136
9	Tabellenverzeichnis.....	140
10	Publikation.....	141
11	Danksagung.....	142
12	Eidesstattliche Versicherung.....	143

Überblick

Disulfiram ist ein ursprünglich zur Behandlung von Alkoholmißbrauch eingesetztes Medikament, von dem eine antitumorale Wirkung bei verschiedenen Karzinomen beschrieben wurde. Die vorliegende Arbeit beschreibt die Wirkung von Disulfiram auf ovariäre Tumorzelllinien und soll zum weiteren Verständnis der Wirkungsweise von Disulfiram auf humane Tumorzellen beitragen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Disulfiram in Kombination mit Kupferionen oxidativen Stress und eine Hitzeschock-ähnliche Reaktion in den untersuchten Zellen auslöst, die schließlich einen irreversiblen Zelltod herbeiführt. Die Wirkung der angewendeten Substanzen wurde auf morphologischer Ebene durch Immunfluoreszenzfärbungen sichtbar gemacht, und auf molekularbiologischer Ebene wurden mit Hilfe von PCR und Western Blot Analyse Veränderungen in der Genexpression genauer untersucht. Hierbei wurde besonderes Augenmerk auf die Hitzeschockreaktion der Zelle gelegt. Es konnte eine Induktion der zellulären Hitzeschockproteine HSF1, HSP70, HSP40 und HSP32 sowie eine Phosphorylierung und Dimerisation von HSP27 und dessen Akkumulation in paranukleären Aggregaten beobachtet werden. Außerdem führte die Anwendung von Disulfiram/Kupfer zu einer Aktivierung der c-Jun N-terminalen Kinase und einer Hemmung des antiapoptotisch wirkenden Faktors mcl1 sowie zu einer durch Stress im Endoplasmatischen Retikulum (ER) induzierten, proapoptotischen CHOP Aktivierung. Der Nachweis polyubiquitinerter Proteine und die Stressinduktion in Zytosol und ER zeigte eine Aggregation zytotoxischer Proteine in verschiedenen subzellulären Kompartimenten, die ebenfalls zum Zelltod beitragen. Die zytotoxische Wirkung von Disulfiram/Kupfer auf die Ovariäalkarzinomzellen wurde durch gleichzeitige Inhibierung des protektiven Thioredoxinsystems mit Auranofin verstärkt. Die Ergebnisse zeigen, dass Disulfiram/Kupfer als ein interessantes Repositionierungsmedikament für die Behandlung des Ovariäalkarzinoms in Frage kommen könnte.

1 Einleitung

1.1 Medikamentenrepositionierung

1.1.1 Grundzüge der Arzneimittelentwicklung

Bevor ein Medikament beim Patienten zum Einsatz kommt, hat es bereits eine langjährige Entwicklungsphase hinter sich. Nach der präklinischen Forschung durchläuft das potentielle Medikament üblicherweise vier Phasen der klinischen Prüfung. In Phase I wird die Substanz an gesunden Probanden hinsichtlich der Verträglichkeit, der Kinetik, des Metabolismus und der Elimination untersucht. In Phase II wird die zu untersuchende Substanz erstmals einer kleinen Anzahl von Patienten appliziert. In Phase III wird die Wirksamkeit der Substanz an einer größeren Patientengruppe gegenüber einer Placebo Therapie oder einem bereits etablierten Medikament getestet. In den ersten drei Phasen soll der Wirksamkeitsnachweis erbracht und die Unbedenklichkeit der Anwendung evaluiert werden, um die Zulassung der Substanz zu ermöglichen. Erst nach der Zulassung eines Medikaments beginnt die Phase IV, in der die Langzeitwirkungen der Substanz auf den Menschen analysiert werden (Lüllmann, 2010).

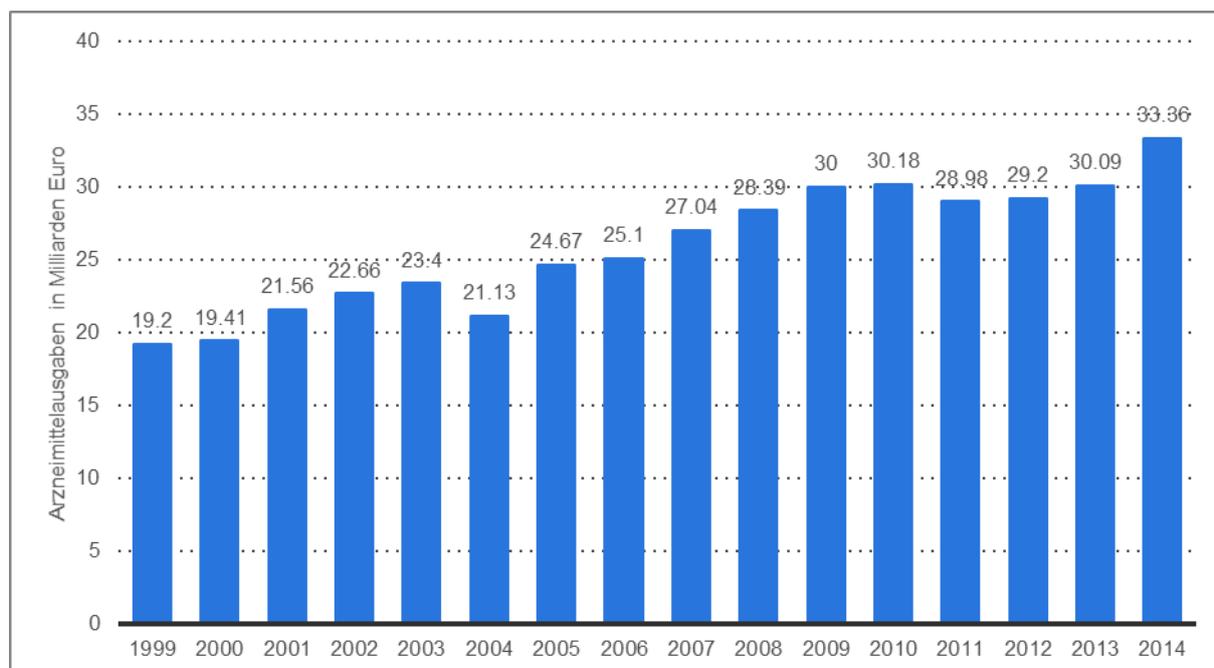


Abbildung 1: Arzneimittelausgaben der gesetzlichen Krankenversicherung: in den Jahren 1999 bis 2014 in Milliarden Euro in Deutschland (Arzneimittelausgaben der GKV. Statistica 2015)

So vergehen etwa 10 bis 17 Jahre von der Entwicklung eines Pharmakons bis zum Durchlauf aller Qualitätskontrollen und Studien (Tobinick, 2009). Von 5.000 bis 10.000 Wirkstoffen, die in Frage kommen, kann oft nur ein Wirkstoff zugelassen werden. Daher kostet ein auf den Markt gebrachtes Medikament Unternehmen zwischen 970 Millionen und 1,6 Milliarden US-Dollar (Verband Forschender Arzneimittelhersteller, www.vfa.de/embed/statistics-2012). Die hohen Kosten für die Arzneimittelherstellung und deren Vermarktung führen zu stetig steigenden Ausgaben der gesetzlichen Krankenversicherungen für Arzneimittel (Abbildung 1, Arzneimittelausgaben der GKV, 1999 -2014).

1.1.2 Begriffsklärung Medikamentenrepositionierung

Um die Kosten sowie die Zeit für die Entwicklung neuer Medikamente zu reduzieren, ist es wichtig, mögliche Einsparungspotentiale zu identifizieren und zu nutzen (Munos, 2009). Eine Möglichkeit wäre die Medikamentenrepositionierung. Hierbei werden als Alternative zur Entwicklung neuer Substanzen bereits zugelassene Medikamente auf bisher ungenutzte Wirkungsbereiche untersucht. Idealerweise können dann für eine bestimmte Erkrankung zugelassene Pharmaka für weitere Indikationen therapeutisch genutzt werden. Dieser Vorgang wird als Medikamentenrepositionierung (Drug Repositioning) bezeichnet (Ashburn und Thor, 2004; Chong und Sullivan, 2006). Tatsächlich sind die genauen Wirkmechanismen vieler Medikamente nicht vollständig erforscht und die Interaktionen eines Pharmakons mit verschiedenen Zielstrukturen im menschlichen Körper nicht immer bekannt (Mestres et al., 2008). Im Rahmen neuer Erkenntnisse zu molekularbiologischen Zusammenhängen von Erkrankungen und zu Interaktionen eines Pharmakons mit bis dahin unbekanntem Zielstrukturen können neue klinisch relevante Indikationen für diese Substanz erarbeitet werden (Campillos et al., 2008; Keiser et al., 2009; Mestres et al., 2011). Bereits zugelassene Medikamente sind im Allgemeinen nicht nur auf ihre Verträglichkeit und ihre pharmakokinetischen Eigenschaften hinreichend untersucht, auch die Darreichungsform und industrielle Herstellung sind in den meisten Fällen etabliert (Ashburn und Thor, 2004; Longman, 2004). Besonders bei älteren Medikamenten, die bereits die Phase IV durchlaufen

haben, sind mögliche Nebenwirkungen auch nach längerer Einnahmedauer ausreichend beschrieben. Außerdem kann meist auf einen großen Literatur- und Erfahrungsfundus zurückgegriffen werden, um das Risikoprofil des Medikaments einzuschätzen (Oprea und Mestres, 2012). Viele Medikamentenwirkungen werden selbst nach der Zulassung erst durch langjährige Erfahrungen und nach dem therapeutischen Einsatz an einer größeren Anzahl von Menschen beobachtet. Die hämolytische Wirkung des Malariamedikaments Primaquin auf Menschen mit Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Mangel fiel erst durch den extensiven Gebrauch bei den US-amerikanischen Truppen in Tropengebieten auf (Ashley et al., 2014; Baird und Hoffman, 2004; Carr et al., 2005). Auch die Bisphosphonat-assoziierten Kiefernekrosen wurden erst nach der Zulassung von Bisphosphonaten u.a. zur Therapie der Osteoporose und Knochenmetastasen beschrieben (Marx, 2003; Walter et al., 2008; Malden und Pai, 2007; Drake et al., 2008). Durch Repositionierung von Medikamenten, also der Erforschung zusätzlicher Wirkungsbereiche klinisch angewandter Substanzen, können unter Beibehaltung der bisher empfohlenen Dosierung Phase I und Phase II des Zulassungsverfahrens umgangen werden (Oprea et al., 2011). Auf diese Weise können durch erweiterte Ausschöpfung des Potentials bereits etablierter Medikamente Kosten und Risiken der Entwicklung minimiert werden und Patienten möglicherweise deutlich schneller geholfen werden (Oprea und Mestres, 2012; Ashburn und Thor, 2004).

1.1.3 Beispiele Medikamentenrepositionierung

Ein bekanntes Beispiel für erfolgreich durchgeführte Medikamentenrepositionierung ist das ursprünglich für die Therapie von Angina pectoris entwickelte Sildenafil, welches heute unter dem Handelsnamen Viagra vor allem zur Behandlung der erektilen Dysfunktion eingesetzt wird (Langtry und Markham, 1999). Auch der Östrogenrezeptormodulator Raloxifen wurde zunächst für die Behandlung von Brust- und Prostatakarzinomen entwickelt und wird heute zusätzlich zur Osteoporosetherapie verwendet. Tragische Bekanntheit hat der zur Behandlung von Schlafstörungen und Morgenübelkeit von Schwangeren eingesetzten Wirkstoff Thalidomid erreicht, das aufgrund seiner teratogenen Wirkung vom Markt genommen

wurde (Fletcher, 1980; Knobloch und Ruther, 2008; Tsao, 2004; Ratner, 2001). Erst nachdem die Angiogenese hemmenden Eigenschaften von Thalidomid entdeckt wurden, konnte einerseits die schädigende Wirkung auf die Extremitätenentwicklung von Föten erklärt werden, andererseits wurde der Wirkstoff für die onkologische Therapie interessant. Unter strengen Sicherheitsauflagen kann Thalidomid heute zur Therapie von Lepra und Multiplem Myelom indiziert sein (D'Amato et al., 1994).

Medikament	Ursprüngliche Indikation	Neue Indikation
Acetylsalicylsäure	Analgesie	Thrombozytenaggregationshemmung
Allopurinol	Virale Infektion	Morbus Parkinson
Arsen	Syphilis	Leukämie
Atomoxetine	Depression	ADHS
Betablocker	Hypertonie	Herzinsuffizienz
Bupropion	Depression	Nikotinentwöhnung
Etanercept	Rheumatoide Arthritis	Psoriasis
Finasterid	Benigne Prostatahyperplasie	Androgenetische Alopezie
Hydroxychloroquin	Malaria	Arthritis
Metronidazol	Bakterielle Infektion	Rosazea
Raloxifen	Kontrazeption	Osteoporoseprophylaxe
Sildenafil	Angina Pectoris	Erektile Dysfunktion
Stickstoffmonoxid	Angina Pectoris	Pulmonale Hypertension
Thalidomid	Insomnie	Multipl. Myelom

Tabelle 1: Überblick über bereits repositionierte Medikamente (vgl. Verma et al., 2005; Padhy und Gupta, 2011; Aronson, 2007; Hahn, 2013; Patchala und Jegga, 2015)

Medikament	Indikation	Alternative Indikation
Aprepitant	Übelkeit nach Zytostatikatherapie	Glioblastom, Mammakarzinom
Artesunate	Malaria	Kolonkarzinom, Rhabdomyosarkom,
Bortezomib	Multipl. Myelom	Ovarialkarzinom, Zervixkarzinom
Captopril	Arterielle Hypertonie,	Nierenzellkarzinom
Celecoxib	rheumatische Arthritis, Arthrose	Mammakarzinom, Cervixkarzinom
Cholinesteraseinhibitoren	Senkung des Cholesterinspiegels	Demenz bei Parkinsonerkrankung
Furazolidon	Bakterielle Infektion	AML
Galantamin	Morbus Alzheimer	Glaukom
Gemcitabin	Zytostatische Therapie	HIV Infektion
Itraconazol	Mykose	Lungenkarzinom, Basalzellkarzinom,
Lidocain	Lokalanästhesie	Asthma bronchiale
Mifepriston	Abruptio Gravidatis	Depression
Nelfinavir	HIV Infektion	Prostatakarzinom, Mammakarzinom
Nitroxoline	Harnwegsinfektion	Harnblasenkarzinom,
Nortriptylin	Depression	Malaria
Ritonavir	HIV Infektion	Urothelkarzinom
Sertralin	Depression	Prostatakarzinom
Vardenafil	Erektile Dysfunktion	Präeklampsie

Tabelle 2: Überblick über Medikamente, die im Rahmen der aktuellen Forschung auf mögliche alternative Indikationen untersucht werden (Kast, 2010; Munoz et al., 2014; Munoz et al., 2015; Aznab und Rezaei, 2015; Liu und Cui, 2013; Jin et al., 2013; Krishna et al., 2014; Beccafico et al., 2015; Brüning et al., 2009; Shi et al., 2015; Kast et al., 2014; Araújo, 2015; Banno et al., 2015; Rolinski et al., 2012; Jiang et al., 2013; Almasieh et al., 2013; Clouser et al., 2012; Beach et al., 2014; Casado et al., 2015; Rudin et al., 2013; Antonarakis et al., 2013; Kim et al., 2014; Mitsuhashi et al., 2014; Li et al., 2014; Yang et al., 2005; Brüning et al., 2010; Shim et al., 2012; Shim et al., 2010; Mirkovic et al., 2011; Kaiser et al., 2015; Batchu et al., 2014; Sato, 2015; Huang et al., 2011; Kakigano et al., 2015)

1.1.4 Medikamentenrepositionierung in der Krebstherapie

Trotz vieler neuer molekularbiologischer Erkenntnisse zur Krebsentstehung liegt die Entdeckung und Entwicklung neuer Medikamente für die Krebstherapie weit zurück (Howlader et al., 2011). Deswegen sollten gerade in der Krebstherapie alle möglichen Ressourcen und Therapieansätze genutzt werden (Telleria, 2012). Nach Schätzungen der WHO werden die Neuerkrankungen an Krebs von jährlich 10 Millionen weltweit im Jahr 2000 auf 15 Millionen Neuerkrankungen im Jahr 2020 steigen (Mignogna et al., 2004). Im Rahmen der Medikamentenrepositionierung kann auf Medikamente zurückgegriffen werden, die nicht zur onkologischen Therapie entwickelt wurden, aber an Zielstrukturen in der entarteten Zelle binden. Dies könnte einen wertvollen Beitrag zur weltweiten Krebstherapie leisten, insbesondere da es eine finanzierbare Alternative bietet (Dueñas-González et al., 2008). So postulieren Richard Kast et al. bei neun von ausschließlich für nicht-onkologische Therapien zugelassenen Medikamenten wie Disulfiram und Auranofin eine hemmende Wirkung auf unterschiedliche Faktoren des Stoffwechsels von Glioblastomzellen. Die pharmakologischen Eigenschaften dieser Medikamente sind vielfach beschrieben; sie werden aufgrund eines geringen Potentials an unerwünschten Nebenwirkungen gut vertragen und belasten den Patienten nicht zusätzlich (Kast et al., 2013).

1.2 Ovarialkarzinom

1.2.1 Epidemiologie

Bedauerlicherweise steht die Entwicklung von Medikamenten für Erkrankungen mit geringerem finanziellen Potential wie Infektionserkrankungen und seltene Krebserkrankungen nicht im Fokus der Arzneimittelhersteller (Kaitin, 2010; Ashburn und Thor, 2004; Howlader et al., 2011). So ist die Entwicklung von Medikamenten speziell zur Behandlung von Ovarialkarzinom mit einer verhältnismäßig geringen Inzidenz wenig rentabel (Telleria, 2012). Weltweit erkrankten im Jahr 2012 über 200.000 Frauen an einem Ovarialkarzinom. Im internationalen Vergleich bestehen große Unterschiede zwischen den Ländern (Ferlay et al., 2012). In Deutschland

werden jährlich etwa 7.380 Neuerkrankungen an Ovarialkarzinom mit 5.646 Todesfällen pro Jahr registriert (Krebsregister Deutschland. RKI, 2012). Ovarialkarzinome belaufen sich auf 3,3% aller malignen Neubildungen der Frau und 5,6% aller Krebssterbefälle in Deutschland. Immerhin steht das Ovarialkarzinom trotz vergleichsweise niedriger Fallzahlen an 5. Stelle der Krebsneuerkrankungen nach Mamma-, Kolon-, Lungen- und Endometriumkarzinom (Kreienberg et al., 2009; Burges und Schmalfeldt, 2011). Die relative 5-Jahres Überlebensrate in Deutschland liegt derzeit bei 41% und ist damit im Vergleich zu anderen Krebserkrankungen deutlich schlechter (www.krebsdaten.de, 2012). Das mediane Erkrankungsalter liegt bei 63 Jahren (Ries et al., 2005).

1.2.2 Ätiologie und Risikofaktoren

Ovarialkarzinome entwickeln sich aufgrund einer Vielzahl molekularer Aberrationen der Zellen. Besonders häufig besteht eine Assoziation zur Mutation des TP53 Gens, welches das Tumorsuppressorgen p53 codiert (Lee et al., 2015, The cancer genome atlas research network, 2011). Die genetischen Veränderungen führen zu einer Aktivierung von Onkogenen und Wachstumsfaktoren sowie zu einer Inaktivierung von Tumorsuppressoren. Sequenzänderungen oder epigenetische Veränderungen der DNA betreffen die Funktion von zellulären Proteinen, die Signaltransduktion oder die Angiogenese und führen zu ungehinderter Proliferation, invasivem Wachstum und Metastasierung (Kreienberg et al., 2009). Bis zu 95% der Ovarialkarzinome gehen vom Epithelgewebe des Eierstocks aus (Kurmann und Shih le, 2011). Bei etwa 10% der Ovarialkarzinome liegt eine Keimbahnmutation der Gene BRCA1 und BRCA2 zugrunde (Risch et al., 2001). Neben der genetischen Prädisposition wird das Risiko, an einem Ovarialkarzinom zu erkranken, durch verschiedene reproduktive und endokrine Aspekte beeinflusst. Faktoren, die mit einer erhöhten Anzahl an Ovulationen einhergehen wie Nulliparität, frühe Menarche und späte Menopause wirken sich fördernd auf die Entwicklung eines Ovarialkarzinoms aus. Ovulationen und Follikelrupturen führen zu wiederholten Traumen an der epithelialen Oberfläche des Ovars. Die anschließenden Reparaturmechanismen sowie die Proliferation der ovariellen Epithelzellen durch DNA-Replikation bilden die Grundlage

zur Entstehung neuer Mutationen (Schildkraut et al., 1997). Entsprechend kann durch eine längere Einnahme von oralen Kontrazeptiva ein protektiver Effekt erreicht werden (McGuire et al., 2004). Nach neueren histopathologischen Analysen scheint jedoch das Epithel im Bereich der oviduktalen Fimbrien eine Rolle bei der Karzinomentwicklung zu spielen. Entsprechend dieses Ansatzes soll sich das Malignom primär im Bereich der Tube entwickeln und erst dann ovarielle Metastasen ausbilden (Kurman und Shih, 2011; Dietl, 2014; Auersberg, 2013). Tubenligatur und Hysterektomie scheinen mit einem verminderten Risiko für Ovarialkarzinom assoziiert zu sein. Eine mögliche Erklärung könnte die mechanische Barriere für die über Uterus und Tuben aufsteigende Kanzerogene sein (Whittemore et al., 1992; Chiaffarino et al., 2005, Harmsen et al., 2015). Ebenso scheinen Hormonersatztherapie über 10 Jahre (Rodriguez et al., 2001) sowie die Erkrankung an Endometriose das Risiko für die maligne Entartung zu erhöhen (Wang et al., 2015). Auch Umwelteinflüsse wie Rauchen werden als Risikofaktoren beschrieben (Pan et al., 2004). Nicht eindeutig ist der Einfluss der Ernährung auf die Entstehung eines Ovarialkarzinoms (Kreienberg et al., 2009). Der Konsum antioxidativ wirkender Vitamine wie Vitamin A, C oder E scheint keinen Einfluss auf die Tumorentwicklung zu haben (Fairfield et al., 2004). Auch die Assoziation von Ovarialkarzinom und erhöhtem Body-Mass-Index ist noch nicht eindeutig geklärt (Fairfield et al., 2002; Engeland et al., 2003, Protani et al., 2012).

1.2.3 Symptome und Diagnostik

Das Ovarialkarzinom verursacht bei den Betroffenen meist kein charakteristisches Beschwerdebild. Die Patientinnen leiden an eher unspezifischen Symptomen wie abdominalen Schmerzen, Appetitlosigkeit, Obstipation, Diarrhöe, Übelkeit und Erbrechen, Völlegefühl im Unterbauch und Dyspareunie. Außerdem kann es zu unklarem Gewichtsverlust bei gleichzeitiger Zunahme des Leibesumfangs kommen (Borges und Schmalfeldt, 2011). Bei 40–75% aller Patientinnen mit Ovarialkarzinom ist ein Tumor im Abdomen palpabel und bei 20–30% lässt sich bereits klinisch Aszites nachweisen (Kreienberg et al., 2009). Diagnostisch erfolgt zunächst ein

transvaginaler Ultraschall zur sonografischen Beurteilung der Adnexe (Prömpeler et al., 2000). Zur weiteren Abklärung des Befundes kann zusätzlich ein CT

mit Kontrastmittel durchgeführt werden (Imaoka et al., 2006). Außerdem besteht die Möglichkeit, die Konzentration des Tumormarkers CA 125 im Serum zu bestimmen. Der Marker ist bei 80% der Patientinnen mit einem Ovarialkarzinom erhöht. Dennoch eignet sich CA 125 nicht zum primären Screening in der Normalbevölkerung, da die falsch positiven Testergebnisse inakzeptabel hoch wären (Carlson et al., 1994). Die Spezifität des Tumormarkers ist gering, da nicht nur andere maligne Erkrankungen wie Endometrium,- Mamma,- Bronchial,- oder Pankreaskarzinom mit einer Erhöhung von CA 125 einhergehen (Sjovall et al., 2002), sondern auch Erkrankungen wie Endometriose und Leberzirrhose (Devarbhavi et al., 2002).

1.2.4 Therapiemöglichkeiten und Prognose

Von den Krebserkrankungen des weiblichen Genitaltrakts hat das Ovarialkarzinom die höchste Mortalität; sie nimmt mit fortschreitendem Krankheitsstadium zu. Da die betroffenen Patientinnen keine charakteristische Symptomatik aufweisen, werden 70-80 % erst im fortgeschrittenen Stadium (FIGO III–IV) diagnostiziert. Dies entspricht einer Ausbreitung des Karzinoms im kleinen Becken und Peritonealraum. In diesem Stadium liegt die 5-Jahres-Überlebensrate bei 20–30% (Kreienberg et al., 2009; Burges und Schmalfeldt, 2011; Utler et al., 2005). Die leitliniengerechte Therapie des Ovarialkarzinoms sieht eine operative Komplettresektion des Tumors und eine Behandlung mit Carboplatin und Paclitaxel vor. Bei fortgeschrittenem Befund kann eine stadienabhängige Therapie mit Bevacizumab erwogen werden (S3-Leitlinie Ovarialkarzinom, 2016). Primär spricht das Ovarialkarzinom sehr gut auf die Kombinationstherapie mit Platin und Taxanen an und zeigt Ansprechraten bis zu 80%. Jedoch kommt es bei 75% der so behandelten Patientinnen innerhalb von 2 Jahren nach der initialen Therapie zu einem Rezidiv (Tummala und McGuire, 2005). Nach operativer und anschließender Kombinationschemotherapie verbleiben nur wenige Optionen zum Vorgehen bei wiederkehrendem Befund (Brüning und Mylonas, 2011).

1.3 Disulfiram

1.3.1 Therapie der Alkoholabhängigkeit

Disulfiram (Tetraethylthiuramdisulfid) wird seit 1940 zur Therapie der Alkoholabhängigkeit eingesetzt (Jørgensen et al., 2011). Der größte Teil des im menschlichen Körper aufgenommenen Ethanol wird unter Beteiligung der Alkoholdehydrogenase zu Acetaldehyd oxidiert (Rassow et al., 2008). Anschließend katalysiert die Aldehyddehydrogenase den Umbau von Acetaldehyd zu Acetat, welches dann verstoffwechselt wird. Disulfiram hemmt die Aldehyddehydrogenase. Durch die Hemmung dieses Enzyms kann das Acetaldehyd nicht mehr abgebaut werden und akkumuliert nach Alkoholkonsum (Jørgensen et al., 2011). Hohe Konzentrationen an Acetaldehyd verursachen Intoxikationserscheinungen. Wird nach oraler Zufuhr von Disulfiram Ethanol eingenommen, treten je nach Ethanolmenge Hautrötungen, Palpitationen, Nausea, Dyspnoe, Tachykardie, Erbrechen sowie Kreislaufkollaps und Zyanose auf (Lüllmann et al., 2010). Die Aussicht auf einen solchen Zustand soll den Patienten davon abhalten, erneut Alkohol zu sich zu nehmen und so den Wunsch nach Alkoholkonsum reduzieren (Jørgensen et al., 2011; Arzneimittel-Kompendium CH: Antabus®).

1.3.2 Pharmakologische Eigenschaften

Der Metabolismus von Disulfiram ist komplex. Die Untereinheit des Pharmakons, die die Alkoholdehydrogenase bindet und somit für die Intoxikationsreaktion bei Alkoholkonsum verantwortlich ist, ist noch nicht sicher identifiziert (Liu et al., 2012; Xu et al., 2011; Yip et al., 2011; Guo et al., 2009). In vivo wird Disulfiram nach der Aufnahme im sauren Milieu des Magens oder im Blut durch die Glutathionreduktase der Erythrozyten zu Diethyldithiocarbamid (EtDTC) reduziert (Johansson, 1992). Anschließend kann sich Diethyldithiocarbamid in Diethylamin und Schwefelkohlenstoff zersetzen (Arzneimittel-Kompendium CH: Antabus®). Diese Metaboliten interagieren wiederum mit der katalytisch aktiven Sulfhydrylgruppe der Aldehyddehydrogenase und hemmen so das Enzym (Brüning und Kast, 2014).

Außerdem bildet Diethyldithiocarbamid (EtDTC) Komplexe mit Metallionen darunter Kupfer (Hogarth, 2005). Am Tiermodell konnte gezeigt werden, dass EtDTC in vivo einen Chelatkomplex mit Kupferionen bildet, als $\text{Cu}(\text{EtDTC})_2$ Verbindung die Blut-Hirn Schranke passiert und zu einer Akkumulation von Kupferionen in verschiedenen Geweben wie auch im Nervensystem führt (Suzuki et al., 1997; Tonkin et al., 2004; Delmaestro und Trombetta, 1995).

1.3.3 Medikamentenrepositionierung

Medikamente, die sich gut zur Medikamentenrepositionierung in der Krebstherapie eignen, haben idealerweise definierte pharmakologische Eigenschaften und geringe Nebenwirkungen. Zudem sollten sie mit bereits genau identifizierten wachstumsstimulierenden Faktoren der malignen Zelle interagieren (Kast et al., 2013). Neben den Intoxikationserscheinungen bei der Einnahme von Alkohol sind für Disulfiram kaum schwere Nebenwirkungen beschrieben. So können bis zu 3000mg Disulfiram oral ohne schwere Begleitsymptomatik eingenommen werden (Suh et al., 2006). Unerwünschte Begleiterscheinungen wie Schlaflosigkeit, Kopfschmerzen, Müdigkeit, Mundgeruch, metallischer Geschmack oder Diarrhö treten bei weniger als 10% der Patienten nach der Behandlung mit Disulfiram auf. Die außerdem beschriebene Exazerbation depressiver Schwankungen sowie bei weniger als 0,1% der Patienten auftretende psychotische Symptomatik ereignen sich in Abhängigkeit der eingenommenen Dosis und werden vor allem bei Patienten mit bereits bekannter Depression oder Schizophrenie beobachtet. Selten ($\geq 1/10.000$, $< 1/1.000$) kommt es zu meist reversiblen Störungen der Leberfunktion begleitet von den Symptomen einer akuten Hepatitis mit erhöhten Transaminasen- und Bilirubinwerten. Bisher veröffentlichte Daten zu Genotoxizität und Karzinogenität von Disulfiram zeigen keine entsprechenden Risiken (Arzneimittel-Kompendium CH: Antabus®). Somit sind die Nebenwirkungen bei der Einnahme von Disulfiram durchaus tolerabel und erscheinen gerade für eine antitumorale Indikation im Vergleich zu den gängigen zytostatischen Therapeutika verschwindend gering. Außerdem ist das Patent von Disulfiram seit langem abgelaufen und damit als Generikum ein günstiges Krebsmedikament (Cvek, 2010).

1.3.4 Antitumorale Eigenschaften

Neben der Hemmung des Ethanolmetabolismus interagiert Disulfiram mit verschiedenen Proteinen, die an der Onkogenese beteiligt sind. Bereits 1977 konnte eine vollständige Remission eines Mammakarzinoms bei einer Patientin beobachtet werden, die gleichzeitig unter einer schweren Alkoholkrankung litt und deswegen mit Disulfiram behandelt wurde (Lewison, 1977). In weiteren Studien konnte die antitumorale Wirkung von Disulfiram auf verschiedene Malignome bestätigt werden (Wattenberg, 1978). Darüber hinaus kann durch die Gabe von Disulfiram die Resistenz bestimmter Tumorgewebe gegenüber Chemotherapeutika vermindert werden (Loo und Clarke, 2000). Die Resistenzen maligner Gewebe sind ein großes Problem im klinischen Alltag der Tumorthherapie (Lehnert, 1996). Verschiedene Autoren beschreiben, wie Disulfiram die Wirkung verschiedener klassischer Zytostatika sowie der Strahlentherapie verbessert (Hacker et al., 1982; Bodenner et al., 1986). So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass Disulfiram die zytotoxische Wirkung von Gemcitabin auf Brust- und Kolonkarzinom verstärkt. Da Disulfiram die Blut/Hirnschranke überwinden kann, zeigt das Medikament außerdem Wirkung auf Glioblastomzellen (Guo et al., 2010; Liu et al. 2012).

1.4 Hitzeschockproteine

1.4.1 Funktion

Hitzeschockproteine (HSP) sind Teil eines Systems der intrazellulären Qualitätskontrolle. HSPs verhindern eine fehlerhafte Faltung von Proteinen und deren Aggregation. Sie unterstützen die korrekte Anordnung von Proteinuntereinheiten und die Translokation von Proteinen innerhalb der Zelle (Goloudina et al., 2012; Rassow et al. 2006 S.476). Unter physiologischen Bedingungen bilden ständig ablaufende zelluläre Prozesse wie Translation und Proteintranslokation eine ständige Gefahr für die Homöostase der Zelle und werden durch Hitzeschockproteine reguliert. Als Reaktion auf schädigende Einflüsse, die den Anteil an fehlgefalteten Proteinen in der Zelle erhöhen, wird die Expression von

Hitzeschockproteinen hochreguliert. Die Hitzeschockproteine verhindern die Aggregatbildung der durch die Schädigung vermehrt auftretenden denaturierten Proteine, was ansonsten zum Verlust der Zellfunktion bzw. zum Zelltod führen würde (Vos et al., 2008). Also werden HSPs unter Stressbedingungen wie Hitze, reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS) oder auch zytostatischer Therapie vermehrt exprimiert. Diese Überexpression erlaubt der Zelle, die schädigenden Umwelteinflüsse besser zu überstehen (Garrido et al., 2003; Lanneau et al., 2010). Hitzeschockproteine werden nach ihrem Molekulargewicht in zwei Gruppen eingeteilt. Zu den HSPs mit hohem Molekulargewicht gehören die Familien der HSP90, HSP70 und HSP60. Sie funktionieren als ATP-abhängige Chaperone. Zu den niedermolekularen HSPs gehört das HSP27. Es agiert ATP-unabhängig. Seine Funktion wird durch direkte Phosphorylierung kontrolliert (Lanneau et al., 2010).

1.4.2 Hitzeschockprotein 70 mit Ko-Chaperon HSP40 und HSPA4

Das HSP70 spielt eine wichtige Rolle bei der Proteinfaltung und wird durch verschiedene Stressfaktoren induziert (Guo et al., 2007). Die Funktion des HSP70 ist ATP abhängig. Das Hitzeschockprotein variiert zwischen einem ATP-gebundenen und einem ADP-gebundenen Status. Je nach Status variiert die Affinität des HSPs für ungefaltete Proteine (Mayer und Bukau, 2005). In der ATP-gebundenen Form kann HSP70 das ungefaltete Protein wiederholt schnell binden, es jedoch nicht halten. Erst durch die anschließende Hydrolyse von ATP zu ADP wird die Bindung von HSP70 mit dem Substrat stabilisiert. Die Hydrolysereaktion wird durch das Ko-Chaperon DNAJB1 (HSP40) reguliert (Vos et al., 2008), indem es die ATPase-Aktivität des HSP70 Chaperons stimuliert (Qiu et al., 2006). Ein weiterer Kofaktor, das HSPA4, wirkt als Stress-induzierbarer Nukleotid-Austauschfaktor für HSP70. Im Gegensatz zu DNAJB1 interagiert HSPA4 mit HSP70 in seiner ADP gebunden Form und stimuliert die Dissoziation von ADP (Vergleiche Abbildung 2). Sobald HSP70 dann erneut ATP gebunden hat, löst sich der HSP70/HSPA4 Komplex und HSP70 kann erneut fehlgefaltete Proteine binden (Raviol et al., 2006). Neben der Substratbindung durch HSP70 wird auch die Synthese von HSP70 von der Zelle

reguliert. Durch schädigende Einflüsse auf die Zelle wird HSP70 durch den Hitzeschockfaktor 1 (HSF1) induziert (Goloudina et al, 2012).

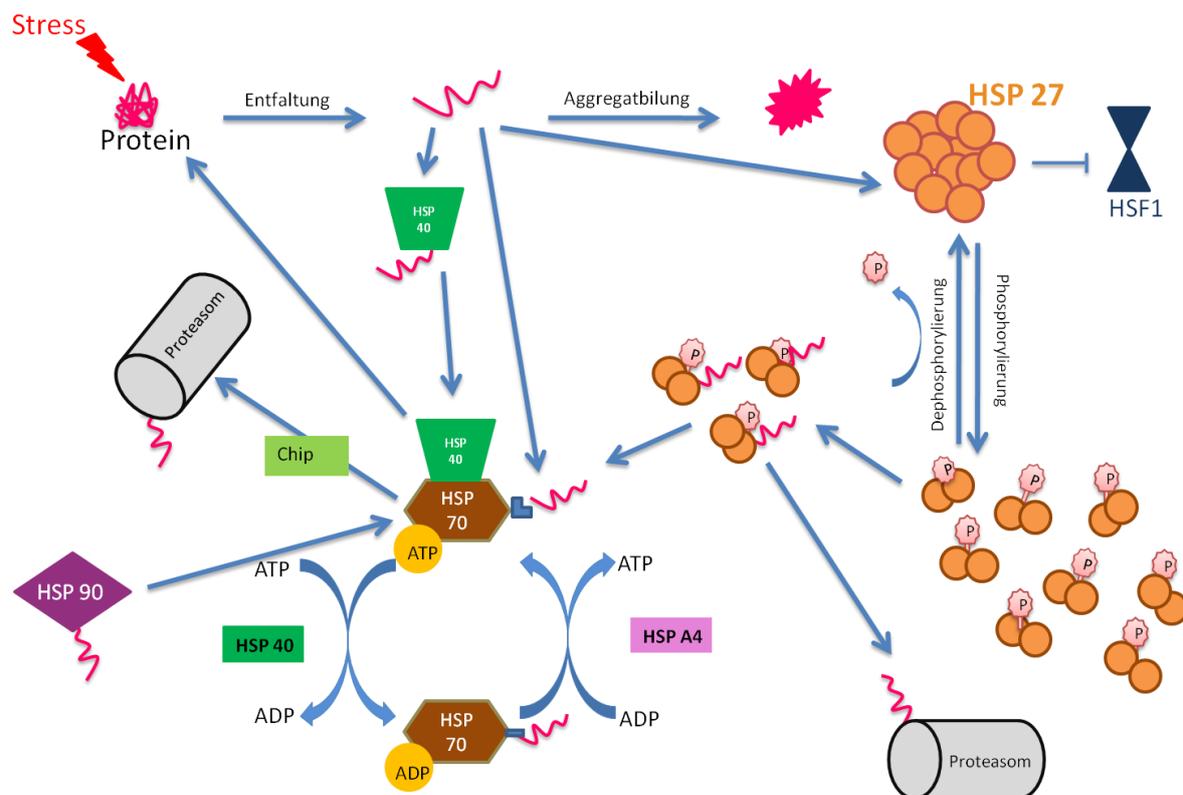


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Hitzeschockreaktion: Nach einem proteotoxischen Ereignis bildet das denaturierte Protein entweder ein zytotoxisches Aggregat oder es wird durch die Hitzeschockproteine der Zelle gebunden. Durch Phosphorylierung zerfällt HSP27 in Dimere und bindet das Substrat. HSP27 führt das entfaltete Protein dem proteasomalen Abbau oder HSP70 zu. Unphosphoryliertes HSP27 hemmt den HSF1. Das entfaltete Protein kann alternativ direkt von HSP70, durch das Cochaperon HSP40 oder durch das HSP90 gebunden werden. Reicht die Hitzeschockreaktion nicht aus, um das Protein wieder in seine korrekt gefaltete Struktur zu überführen, wird es über CHIP dem proteasomalen Abbau zugeführt (modifiziert nach: Vos et al., 2008; Lanneau et al., 2010).

1.4.3 Hitzeschockfaktor 1

Der Hitzeschockfaktor 1 (HSF1) wird konstitutiv in den meisten Zellen exprimiert und wird durch posttranslationale Modifikation reguliert (Wu, 1995). In Abwesenheit schädigender Einflüsse liegt der Hitzeschockfaktor 1 als inaktives Monomer vor. HSF1 wird durch erhöhte Temperatur, oxidativen Stress und Schwermetalle induziert (Anckar und Sistonen, 2011). Als Reaktion auf diesen zellulären Stress geht der HSF1 von einem Monomer in ein Trimer über (siehe Abbildung 3). Das Trimer kann dann wiederum an die DNA binden und ist transkriptionell aktiv (Anckar und Sistonen, 2007). Dieser Übergang von HSF1 in ein aktives Trimer erfolgt durch Hyperphosphorylierung (Kline und Morimoto, 1997). Gleichzeitig führt die Aktivierung zu einer Veränderung der intrazellulären Lokalisation des Faktors. Ist die Zelle keinen schädigenden Einflüssen ausgesetzt, befindet sich der größte Anteil von HSF1 im Nukleus, kann jedoch aufgrund seines monomeren Zustandes zwischen Nukleus und Zytoplasma hin und her pendeln (Mercier et al., 1999; Vujanac et al., 2005). Erst durch die Phosphorylierung während eines Hitzeschocks und des Übergangs von HSF1 in ein aktives Trimer wird der Export von HSF1 in das Zytosol verhindert. Dies führt konsequenterweise zu einer vermehrten Ansammlung von HSF1 im Nukleus (Vujanac et al., 2005). Dort kann der HSF1 in seiner aktivierten trimeren Form an sogenannte Heat-Shock-Response Elements (HSEs) binden, welche sich vor den meisten Hitzeschockgenen befinden. Durch die Bindung wird dann wiederum die Transkription von Hitzeschockproteinen aktiviert (Fujimoto und Nakai, 2010). Das heißt, im Rahmen einer durch einen Stressstimulus ausgelösten Hitzeschockreaktion induziert HSF1 die Transkription von HSP70. So konnten Vera et al. zeigen, dass die Induktion von HSP70 und HSP27 nach einem Hitzeschock in Krebszellen, in denen der HSF1 zuvor gentechnisch ausgeschaltet worden war, maßgeblich reduziert war. Dies führte in den entsprechend vorbehandelten Zellen zu einer Reduktion der Thermotoleranz (Vera et al., 2014). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass dem Hitzeschockfaktor 1 eine grundlegende Bedeutung in der Regulation und Aktivierung der Hitzeschockproteine unter Stressbedingungen zukommt (Wu, 1995; Morimoto, 2008).

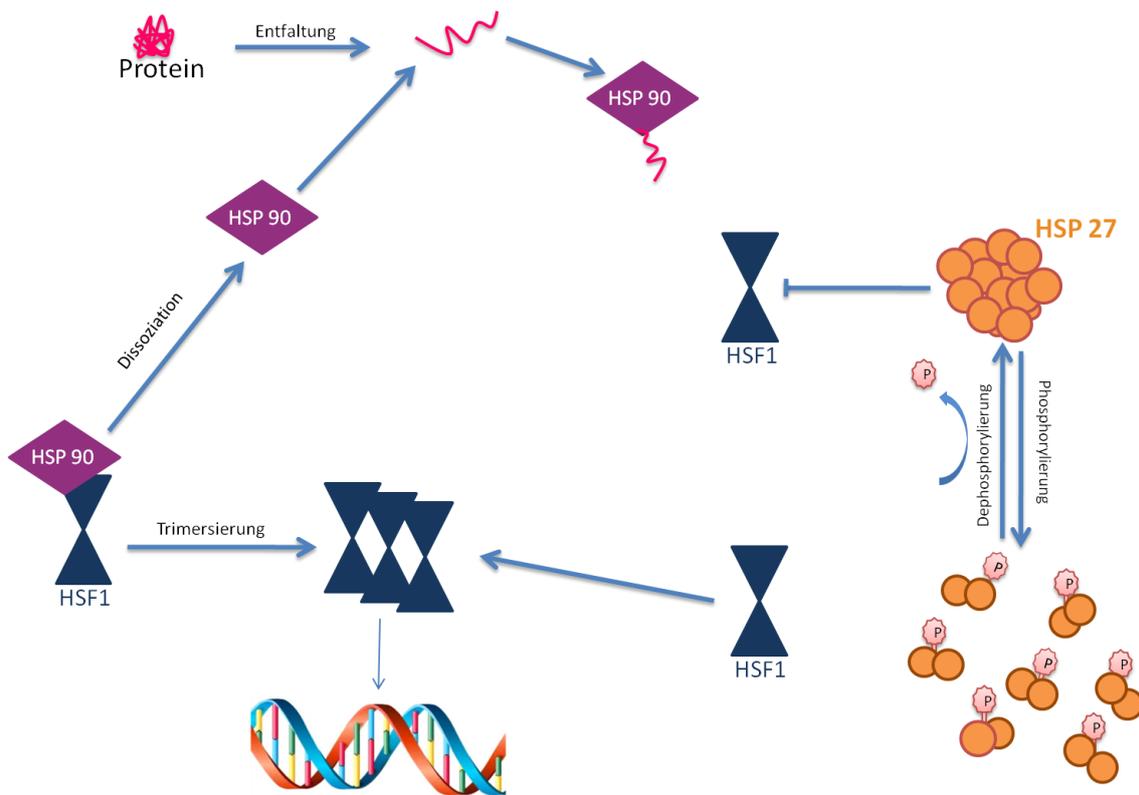


Abbildung 3: Schematisch Darstellung einer möglichen Form der Aktivierung von HSF1: HSF1 wird durch die Assoziation mit Hitzeschockproteinen im inaktiven Zustand gehalten. Als nicht-phosphoryliertes Oligomer blockiert HSP27 die Aktivität des HSF1. Der HSF1 wird auch durch Assoziation mit HSP90 im inaktiven Zustand gehalten. Durch proteotoxischen Stress bindet HSP90 entfaltete Proteine und HSF1 wird frei. Durch stressbedingte Phosphorylierung kommt es zur Dissoziation von HSP27 und somit zur Aufhebung der Blockade von HSF1. Somit kann HSF1 in seine aktive trimere Form übergehen und als Trimer die DNA binden (modifiziert nach: Anckar und Sistonen, 2011; Lanneau et al., 2010).

1.4.4 Ubiquitin und Ko-Chaperon CHIP

Eine weitere wichtige Rolle in der Erhaltung der Zellhomöostase spielt Ubiquitin. Ubiquitin ist ein kleines, evolutionsbiologisch hochkonserviertes Protein in Eukaryonten und ein bekanntes stressinduzierbares Protein. Durch Anhängen von Polyubiquitinketten werden fehlgefaltete Proteine markiert, um dann durch das Proteasom abgebaut zu werden (Rassow et al., 2008, Oh et al., 2013). Werden die polyubiquitinierten Proteine nicht vom Proteasom abgebaut, sind sie hochtoxisch für die Zelle. Alternativ werden sie dann durch Autophagie abgebaut oder als paranukleäre Aggresome abgelagert (Johnston et al., 1998).

1.4.5 Hitzeschockprotein 90

Ein weiteres Hitzeschockprotein aus der Gruppe der hochmolekularen HSPs ist HSP90. Es ist in der gesunden Zelle an den Sekretionswegen und Transportsystemen der Zelle beteiligt. Außerdem sichert HSP90 die Stabilität verschiedener Proteine. Unter Stressbedingungen ist HSP90 unabdingbar für den Ablauf des Zellzyklus (McClellan et al., 2007). Wenn ein Protein unter Stressbedingungen nicht mehr von HSP90 geschützt werden kann und die korrekte Faltung des Proteins fehlgeschlagen ist, wird das Protein ubiquitiniert und einem Proteasom zugeführt (Sugiyama et al., 2000). Im Abbau von fehlgefalteten Proteinen wirken HSP70 und HSP90 häufig gemeinsam (Dezwaan und Freeman, 2008). HSP90 bindet das Protein und überführt es an HSP70. HSP70 ist wiederum mit CHIP assoziiert, welches das Protein dann ubiquitiniert und dem Proteasom zum Abbau zuführt (Doran et al., 2007; de Wit et al., 2004; Fontaine et al., 2003; Jiang et al., 2001) (siehe Abbildung 2).

1.4.6 Hitzeschockprotein 27

Das niedermolekulare HSP27 wirkt ebenfalls als Chaperon in der Zelle. Auch HSP27 bindet unter dem Einfluss von Stress teilgefaltete Proteine, um deren Aggregatbildung zu verhindern. Anschließend werden die von HSP27 gebundenen Proteine auf HSP70 übertragen, damit dieses dem Protein zu seiner richtig gefalteten Form verhelfen kann (Bryantsev et al. 2007; Parcellier et al., 2006). Im Gegensatz zu den ATP-abhängigen Hitzeschockproteinen wie HSP70 wird die Affinität von kleinen Hitzeschockproteinen wie HSP27 nicht durch ATP-Bindung reguliert, sondern durch den Oligomerisierungsstatus des HSPs (Parcellier et al., 2003). Unter physiologischen Bedingungen liegt HSP27 als bis zu 800 kDA großes Oligomer vor, das durch Stressinduktion in dimere Untereinheiten dissoziiert (Parcellier et al., 2006; Shashidharamurthy et al., 2005; Ito et al., 2001). Diese Dissoziation bzw. die erneute Formation von HSP27-Oligomeren ist ein dynamischer Prozess, der vom Phosphorylierungsstatus des Proteins abhängt (Garrido, 2002) (siehe Abbildung 2). Dabei wird HSP27 als Reaktion auf verschiedene Stressestimuli durch die MAP Kinase 2 und 3 an drei Serinresten phosphoryliert (Kostenko und Moens, 2009; Clifton et al., 1996; New et al. 1998). Diese Phosphorylierung der Serinreste führt dann wahrscheinlich zu einer Destabilisierung des HSP27-Oligomers und zu seiner Dissoziation, indem die Interaktion zwischen den Untereinheiten verändert wird (Lambert et al., 1999). Umgekehrt führt die Dephosphorylierung von HSP27 zur erneuten Bildung von Oligomeren (Rogalla et al., 1999) (siehe Abbildung 2). In Abhängigkeit seines Phosphorylierungsstatus kontrolliert HSP27 den Abbau bestimmter Proteine (Lanneau et al., 2010), denn in seiner phosphorylierten Form ist HSP27 an der Ubiquitinisierung von Proteinen beteiligt (de Thonel et al., 2010; Kostenko und Moens, 2009) und führt damit zum verstärkten Abbau von Proteinen durch das Proteasom (Garrido et al., 2006). So begünstigt beispielsweise HSP27 in Stresssituationen die Ubiquitinisierung von Proteinen wie I κ B (Parcellier et al., 2006). Indem HSP27 den Abbau des Nf κ B-Inhibitors I κ B fördert, stimuliert HSP27 indirekt die Aktivität von Nf κ B. Durch Induktion des antiapoptotischen Faktors Nf κ B hat HSP27 also auch Auswirkungen auf das Apoptosegeschehen (Parcellier et al., 2003). Außerdem blockiert HSP27 als großes Oligomer in seiner nicht phosphorylierten Form die Aktivität des Transkriptionsfaktors HSF1 (Brunet et al., 2009) und beeinflusst so wiederum die Hitzeschockreaktion der hochmolekularen Hitzeschockfaktoren (siehe Abbildung 3), da wie oben beschrieben der HSF1 die

Synthese von HSP70 kontrolliert. Die Konformationsänderungen von HSP27 führen nicht nur zu einer veränderten Interaktion von HSP27 mit anderen Hitzeschockproteinen sondern auch mit Aktin, einem Strukturprotein des Zytoskeletts (Lambert et al, 1999; Sun, et al., 2006). Somit ist HSP27 auch an der Regulation des Zytoskeletts sowie an der Zellmigration beteiligt (Kostenko und Moens, 2009).

1.5 Endoplasmatisches Retikulum

Am Endoplasmatischen Retikulum (ER) werden sekretorische Proteine synthetisiert. Störungen der ER-Homöostase beeinträchtigen die Proteinfaltung (Oyadomari und Mori, 2004). Auf Stress reagiert das ER zuerst mit einer Drosselung der Proteinsynthese, um eine Akkumulation fehlgefalteter Proteine zu verhindern (Harding et al., 2002). Im weiteren Verlauf werden dann Gene hochreguliert, die ER-Chaperone kodieren wie beispielsweise BIP (GRP 78) (Yoshida et al., 1998; Caspersen et al, 2000).

1.5.1 BIP

BIP ist ein Chaperon des Endoplasmatischen Retikulums (Bertolotti et al., 2000; Lee, 2001; Shen et al., 2002). Es erleichtert den Proteinfaltungsprozess, indem es durch die Bindung von Proteinuntereinheiten verhindert, dass noch ungefaltete Regionen des Proteins mit der Umgebung interagieren. Bip ist das ER-Pendant zu HSP70 im Zytosol und wird entsprechend über die Bindung von ATP kontrolliert (Baxter et al., 1996; Saris N und Makarow, 1998; Hamilton, 1999). BIP hat eine hohe Affinität für Substrate in seiner ADP-gebundenen Form. Nach Bindung der Substrate an BIP werden sie in ihrer Konformation eingefroren (Flynn et al., 1989; Flynn et al., 1991). Durch den Austausch von ADP zu ATP wird das Substrat anschließend wieder von BIP freigelassen (Flynn et al., 1989) und kann dann weiter gefaltet werden. Durch die erneute Hydrolyse von ATP zu ADP geht BIP wieder in einen Zustand der hohen Affinität über (Braakman et al., 1992; Dorner et al., 1994). Wenn das Endoplasmatische Retikulum Stress ausgesetzt wird und es daraufhin zur Ansammlung von fehlgefalteten Proteinen kommt, wird BIP aktiviert, indem es von

den ER-Stress-Sensoren PERK, IRE1 und ATF6 dissoziiert und die fehlgefalteten Proteine bindet (Parmar und Schroder, 2012; Malhotra und Kaufman, 2007) (siehe Abbildung 4). Durch die antiapoptotischen Eigenschaften von BIP wirkt dessen Induktion vorerst schützend auf das Endoplasmatische Retikulum (Lee, 2001; Rao et al., 2002; Reddy et al., 2003). Wenn die zellulären Schutzmechanismen erfolgreich waren und die Anzahl an fehlgefalteten Proteinen unter ein bestimmtes Niveau fällt, assoziiert BIP mit PERK, IRE1 und ATF6 und die Zelle kehrt zur Homöostase zurück (Hetz, 2012; Tabas und Ron, 2011; Jäger et al., 2012). Sollte die Funktion des Endoplasmatischen Retikulums jedoch zu sehr geschädigt und die zytoprotektiven Mechanismen des ER überwältigt sein, wird die Apoptose eingeleitet (Tabas und Ron, 2011). An deren Ablauf sind drei Signalwege beteiligt, die Aktivierung von CHOP, der c-Jun-Kinase (JNK) und der ER-assoziierten Caspase 9 (Nakagawa et al., 2000; Urano et al., 2000; Nishitoh et al., 2002).

1.5.2 CHOP

CHOP (C/EBP homologous protein) ist ein Transkriptionsfaktor, der aus 2 Regionen besteht, einer DNA-Bindungsregion und einer Leucin-Zipper-Domäne zur Dimerisierung des Proteins (Ron und Habener, 1992; Ubeda et al., 1996). Wenn nach dem ER-Stress der Defekt im Proteinfaltungsprozess nicht gelöst werden kann, wird die Zelle der Apoptose zugeführt. Diese wird durch mehrere Zwischenschritte reguliert und schließlich durch eine Aktivierung von CHOP initiiert (Fornace Jr et al., 1988; Ron und Habener, 1992; Ma et al., 2002) (Vergleiche Abbildung 4). Im Mausmodell konnte wiederholt belegt werden, dass CHOP für einen durch ER-Stress ausgelösten Zelltod notwendig ist (Song et al., 2008; Malhotra et al., 2008; Thorp, et al., 2009; Tabas und Ron, 2011; Pennuto et al., 2008).

1.5.3 C-Jun N-terminale Kinasen

c-Jun N-terminale Kinasen (JNKs) gehören zur Familie der MAP-Kinasen und sind Teil der Proliferations-, Differenzierungs- und Apoptoseprozesse der Zelle (Dhanasekaran und Reddy, 2008). Die JNK stimuliert proapoptotische Signalwege

(siehe Abbildung 4). Sie spielt eine wichtige Rolle sowohl im extrinsischen als auch intrinsischen Signalweg der Apoptose (Elmore, 2007) und gewährleistet so den möglichst effizienten Ablauf des Zelltods (Dhanasekaran und Reddy, 2008). Die Induktion der JNK wird durch oxydativen Stress ausgelöst und erfolgt über die Phosphorylierung an Threonin- und Tyrosinresten des Proteins (Fujino et al., 2007; Boldt et al., 2002; Matsuzawa et al., 2001; Nagai et al., 2007). So konnte gezeigt werden, dass eine aktivierte JNK an der durch Cisplatin verursachten Apoptose bei Ovarialkarzinomzellen beteiligt ist (Chen et al., 1999).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass bei sehr schwerem Stress auf das endoplasmatische Retikulum das proapoptotische Signal von JNK und CHOP stärker ist als der antiapoptotische Effekt der Chaperone (BIP) und deswegen die Apoptose eingeleitet wird (Szegezdi et al., 2006; Yanjun und Hendershot, 2004) (siehe Abbildung 4).

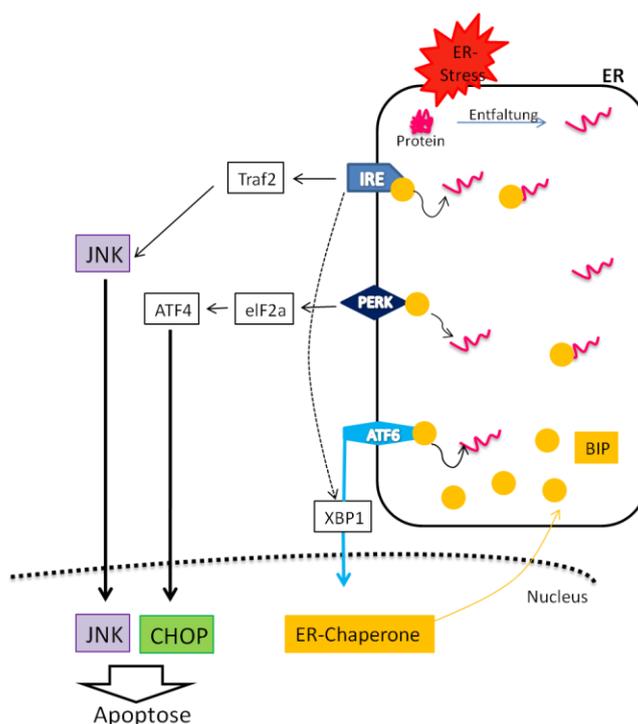


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Stressreaktion im Endoplasmatischen Retikulum: Durch die Akkumulation von fehlgefalteten Proteinen kommt es zur Dissoziation von BIP von PERK, ATF6 und IRE1 in das Lumen des ER. BIP bindet die fehlgefalteten Proteine. PERK, ATF6 und IRE1 werden aktiviert und induzieren unter anderem CHOP und JNK. Bei schwerem ER-Stress überwiegt das proapoptotische Signal von JNK und CHOP den antiapoptotischen Effekt der Chaperone (BIP) und die Apoptose wird eingeleitet. (modifiziert nach: Szegezdi et al., 2006; Ma und Hendershot, 2004; Ulianich und Insabato, 2014)

1.6 Das Thioredoxinsystem

Ein weiterer Mechanismus der Zelle, die Sensitivität gegenüber zellulärem Stress wie zytotoxischen Substanzen zu vermindern, ist das Thioredoxinsystem (Biaglow und Miller, 2005). Das Thioredoxin/Thioredoxinreduktase–System ist ein Kofaktor in der DNA-Synthese. Thioredoxin liefert die Elektronen für die Reduktion der Ribonukleotide zu Desoxyribonukleotiden durch die Ribonukleotid-Reduktase. Bekanntermaßen sind Desoxyribonukleotide essentiell für die DNA-Synthese und somit für die Zellproliferation (Powis und Montfort, 2001). Thioredoxin kann oxidierte Substrate reduzieren, da seine SH-Gruppen reversibel oxidiert bzw. reduziert werden (siehe Abbildung 5). Das nach der Elektronenübertragung selbst oxidierte Thioredoxin wird dann wiederum durch die Thioredoxin-Reduktase NADPH-abhängig regeneriert (Powis und Montfort, 2001; Nishinaka et al., 2001). Entsprechend dem Gluthation-System wirkt auch Thioredoxin antioxidativ (Berggren et al., 2001). Man darf also davon ausgehen, dass Thioredoxin die Zellfunktion schützt, indem es zelluläre Proteine reduziert, die durch oxidativen Stress beschädigt worden sind (Biaglow und Miller, 2005).

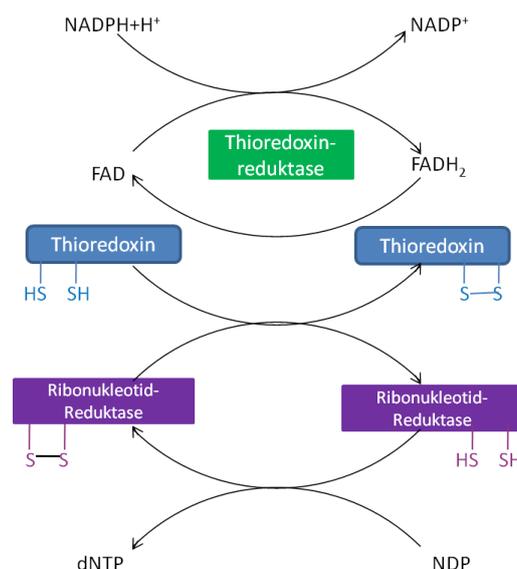


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Thioredoxinsystems: Desoxyribonukleotide entstehen durch Reduktion der entsprechenden Ribonukleotide. Diese Reaktion wird durch die Ribonukleotid-Reduktase katalysiert. Das Enzym wird anschließend durch Thioredoxin reduziert.

Thioredoxin wird dann FADH₂ abhängig durch die Thioredoxin-Reduktase regeneriert (Rassow et al. 2008; Kast et al., 2013)

1.7 Fragestellung

Im Rahmen dieser Arbeit sollten bereits zugelassene Substanzen auf bisher ungenutzte Wirkungsbereiche untersucht werden. Die antitumorale Wirkungsweise von Disulfiram sollte genauer definiert und die Substanz für eine Medikamentenrepositionierung zur Behandlung des Ovarialkarzinoms etabliert werden. Der Einfluss der Substanz auf zellmorphologischer und molekularbiologischer Ebene wurde mit Hilfe von MTT-Tests, Immunblotanalysen, PCR und Immunfluoreszenzmikroskopie beschrieben. Hierbei wurde besonderes Augenmerk auf die Hitzeschockreaktion der Zelle gelegt.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte und Software

Brutschrank, HERAcell 150i	Thermo Fisher Scientific, Roskilde, DK
Stickstofftank	Linde, Unterschleißheim, D
Sterilbank, Laminar Air Flow	Heraeus Instruments, Hanau, D
Zentrifuge, HerausBiofugeStratos	Thermo Scientific Inc., Roskilde, DK
Elektroblotting-Apparat, MiniTransBlot®	BioRadLaboratories GmbH, München, D
Elektrophoresestromquelle, Consort E815	Consort, Parklaan, BEL
Thermocycler (Mastercycler Gradient)	Eppendorf GmbH, Hamburg, D
Fluoreszenzmikroskop, Zeiss Axiophot	Zeiss, Jena, D
Schüttler, VibraxSerono Shaker	Serono, Rockland, USA
MolecularImager, Gel Doc XR+	BioRad Laboratories, München, D
Zentrifuge, Centrifuge 5415D	Eppendorf GmbH, Hamburg, D
Mikroskop (Leitz Periplan)	Leitz, Wetzlar, D
Handzentrifuge	Ltf Labortechnik, Wasserburg, D
Pipettierhelfer (Accu-jet®)	Brand, Wertheim, D
7500 Fast Real-Time-PCR System	Applied Biosystems, Darmstadt, D
Image Lab 2.0 Software	BioRad Laboratories, München, D

2.2 Verbrauchsmaterialien

Pipetten, Eppendorf Research	Eppendorf AG, Hamburg, D
Pipettenspitzen, SafeSealTips Premium	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, D
Serologische Pipetten	Sarstedt AG & Co, Nürnberg, D
Zellkulturplatten (24-well, 6-well)	Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ USA
Zellkulturschale (60.1cm ²)	TechnoPlasticProducts, Trasadingen, CH
Kulturflaschen (50ml, Falcon®)	Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ. USA
8-Well Platte (Millicell® EZ slide)	Millipore Corporation, Billerica, MA, USA
Reagiergefäß (1,5 ml)	Sarstedt AG & Co, Nürnberg, D
Reagiergefäße (15ml, 50ml)	Centrifuge Cups, VWR International, LLC, Radnor, PA, USA

Objektträger	P. Marienfeld GmbH, L.-Königshofen, D
96-Well-Platten	VWR, Ismaning, D
Deckgläser (24x24 mm)	Gerhard Menzel, Braunschweig, D
Filterpapier (583 Gel Dryer, 25)	BioRad Laboratories GmbH, München, D
PVDF Membran (0, 45 µm)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Mini Gel Holder Cassette	BioRad Laboratories, München, D
Fiber Pads (Mini Trans-Blot)	BioRad Laboratories, München, D
Precast Gels 4-10% (Mini Proteom TGX)	BioRad Laboratories, München, D
Agarose-Gele (E-Gel 2% Agarose)	Invitrogen, Karlsruhe, D

2.3 Chemikalien und Biochemikalien

Nährmedium, Dulbecco`s MEM	Biochrom AG, Berlin, D
Fötales bovines Serum	Biochrom AG, Berlin, D
Penicillin/Streptomycin	Biochrom AG, Berlin, D
Phosphate Buffered Saline, Dulbecco`s PBS	PAA Laboratories GmbH, Pasching, AT
Trypsin-EDTA	PAA Laboratories GmbH, Pasching, AT
Ethanol (80% mit Methylethylketon vergällt)	Apotheke LMU, München, D
Coomassie® Brilliantblau G250	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, D
Milchpulver, Blotting Grade	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Natrium-Azid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Tween® 20	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
BCIP Conc. 50mg/ml	Promega, Mannheim, D
NBT Conc. 50mg/ml	Promega, Mannheim, D
Trisphosphat (Pufferan®)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D

2.3.1 Proteinchemische Reagenzien

RIPA-Puffer (Radio-Immunoprecipitant-Assay-Puffer)	Cell Signal, Frankfurt, D
Auftragspuffer (Roti-Load 1, 4xKonz reduzierend/nicht reduzierend)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Transferpuffer (10xTris/Glycine Buffer)	BioRad Lab. GmbH, München, D

Material und Methoden

Laufpuffer (10xTris/Glycine/SDS Buffer)	BioRad Lab. GmbH, München, D
Proteinmarker (Prestained Protein Marker)	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA
Einbettmedium (Mounting Medium with Dapi)	Vector Lab., Inc. Burlingame, CA, USA
Einbettmedium (IMM Mounting Medium)	Ibidi GmbH, Martinsried

2.3.2 Molekularbiologische Reagenzien:

Lyse-und Waschpuffer (RNA-Isolations Kit)	Macherey-Nagel GmbH, Düren, Deutschland
Oligo dT Nukleotide (Oligo dT Primer)	Biomers, Neu-Ulm, D
Reverse-Transkriptase-Puffer (M-MLV RT 5x Buffer)	Promega, Mannheim, D
PCR Nukleotid Mix (d NTP-Mix 10mM)	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, D
Ribonuklease Inhibitor (peq Gold RNase Inhibitor)	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, D
Reverse Trankriptase (M-MLV Reverse Trankriptase)	Pomega, Mannheim, D
PCR Master Mix	Promega, Mannheim, D
DNA-Marker (pBR 328 Mix I, T147.1)	Carl Roth GmbH, München, D
Probenpuffer (6x Mass Ruler Loading Dye Solution)	Fermentas GmbH, St.Leon-Rot, D
ITaq Fast Supermix with Rox	BioRad Laboratories GmbH, München, D

2.3.3 Medikamente/Substanzen

Disulfiram	Axxora, Lörrach, D
Cu(II)Chlorid	Merck, Darmstadt, D
Auranofin	Axxora, Lörrach, D

2.4 Zellkultur und Zelllinien

Die Zelllinien OVCAR-3, SKOV-3, OVMZ-30, OVMZ-31, OVMZ-37 und OVMZ-38 sind in unserem Forschungslabor etablierte, permanente Ovarialkarzinomzelllinien. Die Mammakarzinomzelllinien MCF-7 und MDA-MB-231 sind ebenfalls etablierte Zelllinien und wurden für Vergleichszwecke genutzt. Zellen der Linien OVCAR-3, SKOV-3, OVMZ-31, OVMZ-37, OVMZ-38, MCF-7 und MDA-MB-231 wurden bei 5%igem CO₂ im Brutschrank in Nährmedium kultiviert. Das Nährmedium wurde mit 10%igem fötalem Kälberserum sowie 100U/ml Penicillin und 100µg/ml Streptomycin supplementiert. Bei hoher Zelldichte wurden die Zellen ausgedünnt, um das Zellwachstum nicht zu behindern. Hierzu wurde das Nährmedium entfernt und die Zellen mit PBS-Lösung gewaschen.

Anschließend wurden die Zellen mit Trypsin bedeckt, um eine Ablösung der Zellen vom Boden der Zellkulturflasche zu erreichen. Je nach Zelllinie wurde das Trypsin unterschiedlich lang auf den Zellen belassen. Sobald im Mikroskop eine Abrundung der Zellen beobachtet werden konnte, wurden die Zellen durch vorsichtiges Abklopfen vom Boden der Zellkulturflasche gelöst. Die gelösten Zellen konnten nun verworfen werden, um eine reduzierte Zelldichte zu gewährleisten. Bei Bedarf wurden die gelösten Zellen zur Inaktivierung des Trypsins wieder im Medium aufgenommen. Durch Auf- und Abpipettieren wurde eine homogene Zellsuspension hergestellt. Es wurden je 10.000 Zellen als 500µl Zellsuspension auf der 24-Well Platte verteilt und im Brutschrank kultiviert, bis die Zellen ausreichend dicht gewachsen waren. Anschließend wurden die zu überprüfenden Substanzen Disulfiram, Kupfer und Auranofin in verschiedenen Konzentrationen hinzugegeben. Der Einfluss der Substanzen auf die Zellmorphologie und Zellentwicklung wurde mikroskopisch begutachtet. Die Zellen wurden mit einer Proteinfärbung gefärbt, um die unterschiedliche Zelldichte makroskopisch darzustellen. Hierzu wurde die Nährlösung abgegossen und vergällter Ethanol (80%) auf die Zellen pipettiert, um sie zu fixieren. Es wurde mit Wasser nachgespült, um dann den Protein-Blau-Farbstoff (eine Prise des Farbstoffs Coomassie® Brilliantblau, Sigma-Aldrich GmbH), in 50ml Ethanol (20%) gelöst, auftragen zu können. Nach einer Einwirkungszeit von 6 Stunden wurde die Farbe abgegossen und die Farbüberreste mit destilliertem

Wasser abgespült. Anschließend wurden die angefärbten Zellen begutachtet; ein Zelltod war durch die Abwesenheit von Zellen im Vergleich zur Probe ersichtlich.

2.4.1 Bildung von Zelllysaten

Durch Trypsinisierung wurden je 1 Mio. Zellen entnommen und auf Petrischalen in 10ml Medium kultiviert. Die Zellen wurden dann 24 Stunden lang mit Disulfiram/Kupfer bzw. Auranofin in aufsteigenden Konzentrationen inkubiert. Die Lysate der behandelten Zellen wurden gebildet, um den Einfluss der Substanzen auf Ebene der Proteinexpression zu ermitteln. Zellen der Linien OVCAR-3 und SKOV-3 wurden für 24 Stunden mit 1µM Disulfiram, 1µM Kupferchlorid oder mit einer Kombination aus jeweils 1µM Disulfiram und 1µM Kupferchlorid inkubiert. Alternativ wurden die Ovarialkarzinomzellen OVCAR-3 für 24 Stunden mit 1µM Auranofin, 250nM Disulfiram/Kupfer bzw. mit einer Kombination aller drei Medikamente behandelt. Zellen der Mammakarzinomzelllinien MCF-7 und MDA-MB-231 wurden 24 Stunden lang mit aufsteigenden Konzentrationen Disulfiram/Kupfer (0, 250nM, 500nM bzw. 750nM) behandelt. Außerdem konnte im Rahmen einer Zeitkinetik die Reaktion der Zellen auf eine bestimmte Substanz im zeitlichen Verlauf dargestellt werden. Um den Einfluss von Disulfiram/Kupfer zeitabhängig beurteilen zu können, wurden die Zellen der Linien OVCAR-3 und SKOV-3 mit 1µM Disulfiram/Kupfer behandelt. Die Zellen wurden dann nach 3, 5, 7 bzw. 9 Stunden lysiert, um das Geschehen zum jeweiligen Zeitpunkt festhalten zu können. Zur Lysatbildung wurde das Nährmedium von den Petrischalen abpipettiert und jeweils 300µl RIPA-Puffer auf die Zellen gegeben. Der Puffer führte zur Zellyse und Solubilisierung von Proteinen, ohne die Proteine zu beschädigen. Darüber hinaus minimierte er unspezifische Proteininteraktionen. Nach leichtem Schwenken wurde die Schale 15 Minuten eingefroren. Die sich bildenden Eiskristalle sollten das Aufbrechen der Zellmembran unterstützen. Anschließend wurde die Schale wieder aufgetaut. Die Suspension wurde von der Schale in ein Eppendorf-Cup überführt und 2 Minuten bei 20.000rpm zentrifugiert. Die Bildung eines Pellets aus Zellbestandteilen konnte beobachtet werden. Der Überstand, der die Proteine enthält, wurde abgenommen und mit 100µl Auftragspuffer versetzt. Es wurde unter nicht-reduzierenden und reduzierenden

Bedingungen gearbeitet. Durch Nutzung des reduzierenden Puffers (enthält Mercaptoethanol) wurden die Disulfidbrückenbindungen der Proteine gespalten. Wenn die Zellen der Zellkultur durch die Behandlung mit einer Substanz bereits vom Boden der Petrischale abgelöst waren, wurde das Medium mit den Zellen abpipettiert und in einem 10ml Eppendorf-Cup 3 Minuten lang bei 4000rpm zentrifugiert. Das so gebildete Pellet, das noch unversehrte Zellen enthält, wurde mit 300µl RIPA-Puffer versetzt und dann gleichfalls für 15 Minuten eingefroren.

2.4.2 Zellfraktionierung

Die Zellfraktionierung zur groben Trennung der Bestandteile der Zelle erfolgte durch Zentrifugation. Die Separation von nukleären und zytosolischen Proteinen ermöglichte eine Unterscheidung der Proteinexpression zwischen Nukleus und Zytosol im Western Blot. Durch Trypsinisierung wurden je 1Mio. Zellen der Linien OVCA-3 und SKOV-3 entnommen und auf Petrischalen in 10ml Medium kultiviert. Nach Erreichen einer ausreichenden Konfluenz von 70% wurden die Zellen für jeweils 8 Stunden mit 1µM Disulfiram/Kupfer behandelt. Nach der Trypsinisierung wurden die Zellen erneut in 10ml Medium aufgenommen und in ein Eppendorf-Cup überführt. Die Zellsuspension wurde 3 Minuten lang mit 1.200rpm zentrifugiert. Das entstandene Pellet enthielt die intakten Zellen und wurde in 300µl hypotonen Lysepuffer überführt. Der niedrige osmotische Druck des Puffers führte zum Anschwellen der Zellen und schließlich zum Platzen der Zellmembran, was durch das Einfrieren (Eiskristallbildung) noch unterstützt wurde. Deshalb wurden die Proben 30 Minuten auf Eis gestellt und anschließend 15 Minuten lang eingefroren. Somit lagen Zellorganellen und Zytosol frei. Die Suspension wurde anschließend erneut 3 Minuten lang mit 1.200rpm zentrifugiert. Der Überstand enthielt zytosolische Bestandteile und wurde abgenommen. Das Pellet wurde in 300µl RIPA-Puffer überführt, um die Lyse der nukleären Membran zu gewährleisten. Es erfolgte die Zentrifugation der zytosolischen sowie der nukleären Fraktion für jeweils 3 Minuten bei 20.000rpm. Der Überstand der nukleären Bestandteile wurde mit 100µl Sample-Puffer versetzt. Die zytosolische Fraktion wurde gleichfalls mit 100µl Sample-Puffer

Material und Methoden

versetzt. Die Proben wurden mit Hilfe von Western Blot analysiert. Dabei wurde GAPDH als Marker für die zytosolische Fraktion und MTA2 für die nukleäre Fraktion verwendet.

Lysepuffer: 1mM Dithiothreitol, 0,5% NP-40, 1mM EDTA, 0,1mM Pefabloc (angesetzt in 1:10 verdünntem PBS, pH-Wert 7.4)

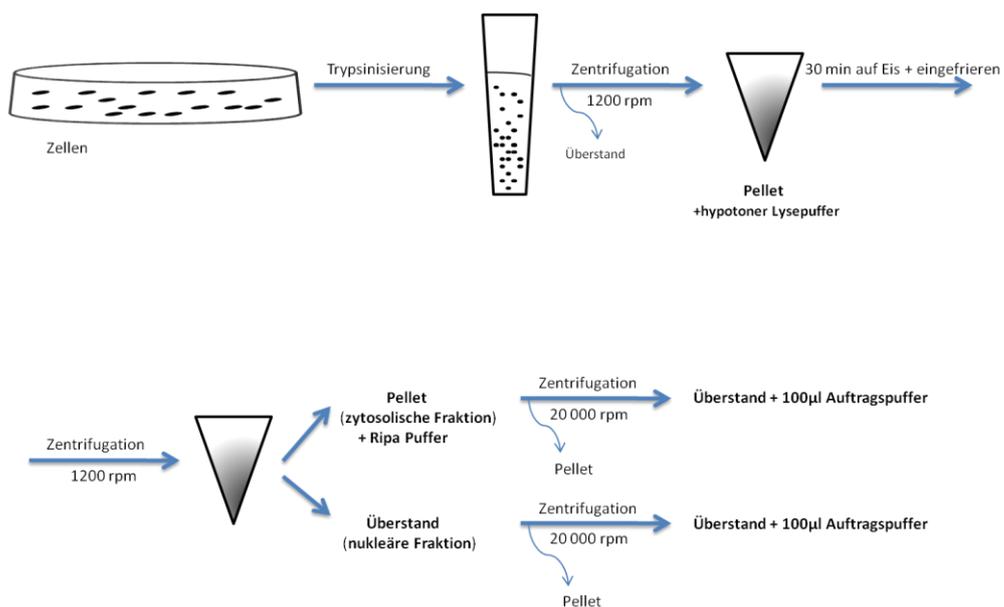


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Zwischenschritte der Zellfraktionierung

2.4.3 Clonal Assay

Ein Reversibilitätsexperiment wurde durchgeführt, um die Wirkung von Disulfiram/Kupfer längerfristig beurteilen zu können. In 24-Well-Platten wurden jeweils 10.000 Zellen in Nährmedium kultiviert und anschließend mit 1µM Disulfiram/Kupfer behandelt. Die Substanzen wurden nach 4 bzw. 8 Stunden entfernt. Die behandelten Zellen wurden trypsinisiert, jeweils 500 Zellen auf eine 6-Well-Platte übertragen und weitere 10 Tage in Nährmedium kultiviert. Die Zellen wurden anschließend mit Ethanol fixiert und mit einer Kristallviolett-Färbung makroskopisch sichtbar gemacht. Hiermit konnte überprüft werden, ob der beobachtete Effekt von Disulfiram/Kupfer möglicherweise reversibel ist. Alternativ wurden 500 Zellen direkt aus der Zellkulturflasche entnommen, auf einer 6-Well-Platte kultiviert und mit den Substanzen behandelt.

2.5 Immunblotanalyse

2.5.1 Gelelektrophorese

Zum Ermitteln der Wirkung der angewendeten Substanzen auf Proteinebene wurden die in den Zelllysaten gewonnenen Proben im Western Blot untersucht. Zwei Mini-Protean-Precast-Gele wurden vorbereitet. Hierzu wurden die Käämme und der Klebestreifen vom Boden der Gel-Kassette entfernt. Die Gel-Kassette wurde in der Gel-Transfer Zelle platziert. In die äußere und innere Kammer wurde Laufpuffer gegeben. Der Laufpuffer enthält SDS (Sodiumdodecylsulfat). SDS ist ein amphipatisches Molekül. Die hydrophobe Kette bindet an hydrophobe Bereiche des Proteins, negativ geladenes SO_3^- interagiert mit Wasser. Durch Abstoßung wird die Sekundär- und Tertiärstruktur des Proteins zerstört. Es bilden sich langgestreckte Protein-SDS-Komplexe. SDS überträgt eine stark negative Ladung auf das Protein und maskiert so dessen Eigenladung (siehe Abbildung 7A). Alle Proteine weisen nun ein ähnliches Masse-zu-Ladung-Verhältnis und eine ähnliche Form auf. Die Migration der Proteine im elektrischen Feld hängt nun nicht mehr von der Eigenladung der Proteine ab sondern von deren Molekulargewicht. Alle mit SDS behandelten Proteine

wandern zur Anode (siehe Abbildung 7B). Die im Vergleich zum nativen Protein erhöhte negative Ladung sorgt außerdem für schnellere Laufzeiten. Mit einer Spritze wurden die Kammern des Gels gespült, bevor 10µl eines Proteinmarkers in eine Kammer und 20µl der Proben in die restlichen Kammern gegeben wurden. Der Kassettenhalter mit den beladenen Gelen wurde an eine Stromquelle angeschlossen. Durch die angeschlossene Ladung von 200V wurde das Proteingemisch entsprechend seiner Größe in Proteinbanden aufgetrennt. Die Elektrophorese wurde beendet, wenn der Proteinmarker die Referenzlinie der Gelkassette erreicht hatte. Die Gelkassette wurde an den entsprechend markierten Stellen mit Hilfe eines Spatels geöffnet.

2.5.2 Immunblotting

Währenddessen wurde die Trägermembran vorbereitet. Zur Aktivierung der PVDF-Membran wurde 100%iger Ethanol verwendet. Anschließend wurde die Membran in Transfer-Puffer equilibriert. Das Gel wurde dann auf die mit Ethanol vorbehandelte größenidentische Membran übertragen. Gel und Membran wurden von Filterpapier und ganz außen von Schaumstoffkissen umgeben und in die Gel-Holder-Kassette geklemmt (siehe Abbildung 7C). Diese wurde zwischen den Elektroden der Blotting-Apparatur (BioRad) platziert, die mit einem vorher gekühlten Transferpuffer gefüllt war. Zusätzlich wurde ein Kühlaggregat eingebracht, um die Temperatur des Laufpuffers zu reduzieren. Senkrecht zum Gel wurde nun eine elektrische Spannung von 100V für 1 Stunde angelegt. So wurden die Proteine auf die Trägermembran übertragen, ohne dass das Muster der elektrophoretischen Auftrennung verändert wurde. Das Gel mit den negativ geladenen Proteinen war zur Kathode hin orientiert, die Membran zur Anode. Die in Richtung Anode wandernden Proteine treffen so auf die Membran. Ansonsten würden sie in den Laufpuffer strömen. Nach dem Transfer der Proteine auf die Membran wurde die Membran in 4%ige Milchpulverlösung gegeben und für 4 Stunden auf das Schüttelgerät gestellt. Das Milchpulver blockiert die freien unspezifischen Proteinbindungsstellen auf der Membran, da sich sonst die Antikörper an diese Bindungsstellen heften und einen spezifischen Nachweis von Antigenen unmöglich machen. Die Transfermembran wurde mit dem Primärantikörper

(angesetzt im Verhältnis 1:1000 in Blockinglösung) gegen das zu untersuchende Protein über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die Membran 3 mal 5 Minuten mit PBS gewaschen. Nach Inkubation des Sekundärantikörpers (angesetzt im Verhältnis 1:1000 in Blockinglösung) für 1,5 Stunden wurde die Membran erneut 3 mal 5 Minuten mit PBS gewaschen. Zuletzt wurde die Färbelösung auf die Membran gegeben, wodurch die Proteinbanden sichtbar wurden (siehe Abbildung 7D). Diese konnten mit Hilfe des verwendeten Markers in ihrem Molekulargewicht eingeordnet werden. Zum Abbruch der Farbreaktion wurde die Membran mit Leitungswasser gespült und getrocknet.

Puffer und Lösungen in verwendeter Konzentration:

Transferpuffer	10% Tris/Glycine Buffer von BioRad Laboratories GmbH in destilliertem H ₂ O
Laufpuffer	10% Tris/Glycine/SDS Buffer von BioRad Laboratories GmbH in destilliertem H ₂ O
Blockinglösung	4% Milchpulver in 1:10 verdünnter PBS, 0.025% Azid, 0.025% Tween 20 von Carl Roth GmbH
Trisphosphat-Puffer	12% Trisphosphat, Tris, Pufferan® von Carl Roth GmbH in destilliertem H ₂ O, Zugabe von HCL zum Erreichen eines PH-Wertes von 9,5
Entwicklungspuffer	10% NaCl, 10% Trisphosphat-Puffer, 0.5% MgCl ₂ ,
Entwicklungslösung	0.33% BCIP, 0.66 % NBT von Promega in Entwicklungspuffer

2.5.3 Verwendete Antikörper

Cleaved PARP	CellSignaling Technology, Frankfurt, Deutschland
HSF1	Cell Signaling Technology, Frankfurt, Deutschland
I κ B	Cell Signaling Technology, Frankfurt, Deutschland
P65	Cell Signaling Technology, Frankfurt, Deutschland
JNK	Cell Signaling Technology, Frankfurt, Deutschland
p-JNK	Cell Signaling Technology, Frankfurt, Deutschland
Ubiquitin	CellSignaling Technology, Frankfurt, Deutschland
HSP70 (W27)	SantaCruzBiotech, Heidelberg, Deutschland
HSP90 α/β (F8)	SantaCruzBiotech, Heidelberg, Deutschland
p-HSP27 (Ser78)	SantaCruzBiotech, Heidelberg, Deutschland
mcl1	SantaCruzBiotech, Heidelberg, Deutschland
GAPDH (0411)	SantaCruzBiotech, Heidelberg, Deutschland
MTA2 (F9)	SantaCruz Biotech, Heidelberg, Deutschland
Alkaline Phosphatase-Sekundärantikörper (Kaninchen bzw. Maus)	Dianova GmbH, Hamburg

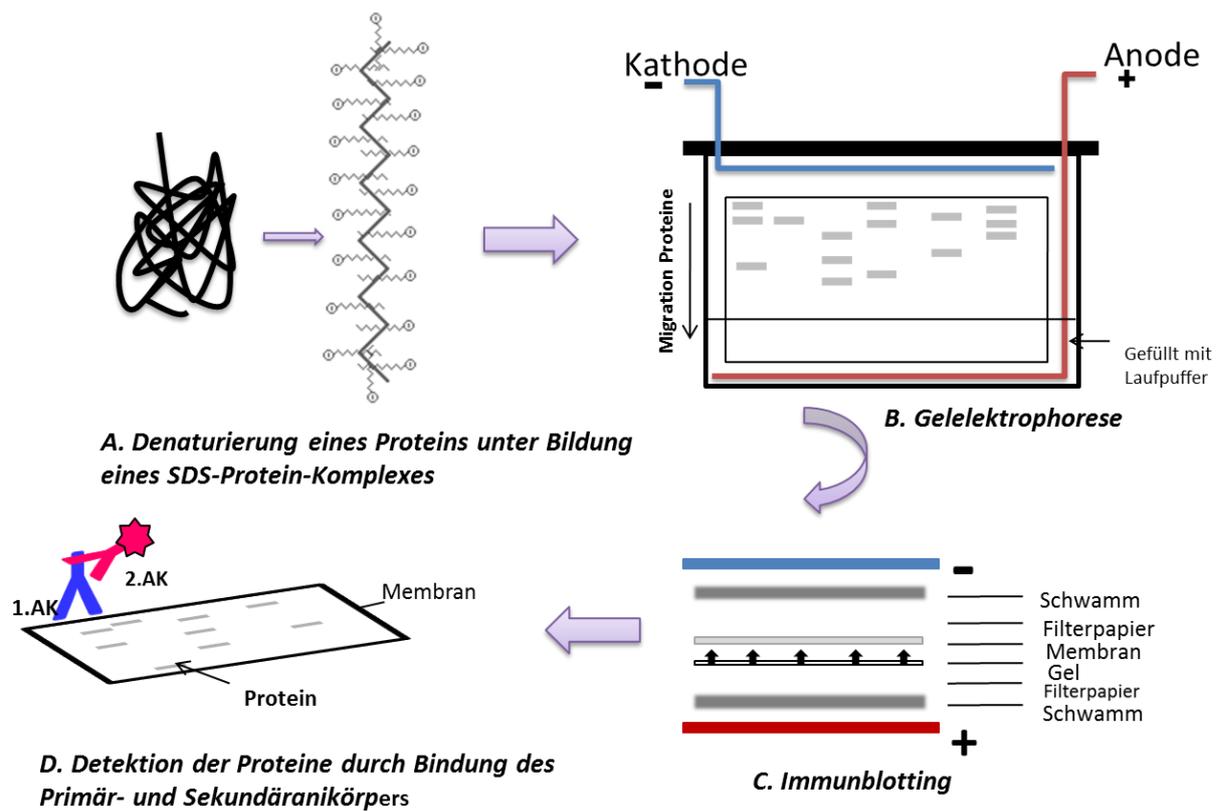


Abbildung 7 : Schematische Darstellung einzelner Zwischenschritte der Immunblotanalyse

2.6 Polymerase-Kettenreaktion

2.6.1 RNA-Isolation

Zellkulturen wurden für eine PCR angesetzt, um auf transkriptioneller Ebene die Wirkung von Disulfiram/Kupfer und Auranofin auf die Zellen zu analysieren. Jeweils 1 Mio. Zellen der Linien OVCAR-3 und SKOV-3 wurden für 3 bzw. 6 Stunden mit der Kombination aus 1µM Disulfiram und 1µM Kupfer (DSF/Cu) behandelt. Jeweils 1Mio. Mammakarzinomzellen MCF-7 wurden 4 Stunden lang in 0,5 bzw. 1µM Disulfiram/Kupfer inkubiert. Zur Darstellung der Wirkung von Auranofin wurden 1 Mio. Zellen der Linie MCF-7 über 24 Stunden mit aufsteigender Konzentration Auranofin (0, 250nM, 500nM, 750nM) behandelt. Nach abgeschlossener Behandlung mit einer Substanz wurde das Medium abgenommen sowie 300µl RA1-Puffer (Marcerey-Nagel, NucleoSpin® -RNA Clean-up-kit) und 300µl Ethanol (100%) zu den Zellen hinzugefügt. Nachdem 300µl RA1-Puffer und 300µl Ethanol (100%) hinzugefügt worden waren, wurde die Lösung in entsprechend markierte Nucleo-Spin-Cups umpipettiert. Anschließend wurde die Lösung für 30 Sekunden zentrifugiert (8000 x g). Das Auffang-Cup und die darin angesammelte Flüssigkeit wurden entsorgt. Nachdem 250µl RA2-Puffer zugegeben worden war, wurden die Proben unter Verwendung eines neuen Auffang-Cups erneut 30 Sekunden lang zentrifugiert. Die durchgelaufene Flüssigkeit wurde erneut entsorgt. Jetzt wurden 700µl RA3-Puffer zugegeben und für weitere 30 Sekunden zentrifugiert. Der Durchlauf wurde erneut verworfen. Nach Zugabe von 350µl RA3-Puffer wurde 2 Minuten lang zentrifugiert. So konnte das Ethanol vollständig entfernt werden. Anschließend wurde das Auffang-Cup verworfen und durch ein nukleasefreies Reaktionsgefäß (1,5ml) ersetzt. Die Membran wurde bei offenem Deckel 3 Minuten lang getrocknet. Das Protokoll des Herstellers sieht das Eluieren der RNA in 60µl RNAse freiem Wasser vor. In dieser Arbeit wurde die RNA in 33µl RNAse freiem Wasser eluiert, um eine höhere RNA-Konzentration in den Proben zu erreichen. Anschließend wurden die Proben nochmals 1 Minute lang zentrifugiert (Protokoll „RNA clean-up“- User manual von Marcerey-Nagel March 2012/Rev.03).

2.6.2 C-DNA - Synthese

Die so gewonnene RNA wurde nun mit Hilfe des Enzyms Reverse-Transkriptase in komplementäre DNA (c-DNA) umgeschrieben. Das RNA-abhängige Enzym benötigt zur c-DNA-Synthese einen Primer, der an die RNA bindet. Zu der extrahierten RNA wurde 1,5µl oligo-dT als Primer gegeben. Der Primer ist komplementär zur Poly-A-Sequenz der messenger-RNA. Um die Bindung der Oligonukleotide zu ermöglichen, wurde die Lösung 5 Minuten lang bei 70°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde auf Eis gearbeitet, um eine Renaturierung der Proben zu verhindern. Der Lösung wurden 10µl Reverse-Transcriptase-Puffer, 2,5µl Nukleotid-Mix, 0,5µl Ribonuklease-Inhibitor sowie 1,5µl Reverse-Transkriptase zugegeben. Es folgte eine 60-minütige Inkubation bei 42°C, während der die Synthese der c-DNA mittels reverser Transkription stattfand. Das Produkt war ein c-DNA-Strang, der mit dem ursprünglichen RNA-Strang hybridisiert war. Da die ursprüngliche Matrize eine prozessierte RNA war, die u.a. das Splicing schon durchlaufen hat, finden sich auf der c-DNA im Gegensatz zur natürlichen eukaryotischen DNA keine Introns.

C-DNA-Synthese (einfacher Ansatz)

1,5µl Oligo-dT-Nukleotide, 5-minütige Inkubation bei 70°C

10µl Reverse-Transkriptase-Puffer von Promega

2,5µl PCR-Nukleotid-Mix von Peqlab

0,5µl Ribonuklease-Inhibitor Peqlab

1,5µl Reverse-Transkriptase von Promega, 60-minütige Inkubation bei 42°C

2.6.3 Real-Time-PCR

Zur Quantifizierung der gewonnenen c-DNA wurde eine Real-Time-PCR durchgeführt. Die Real-Time-PCR ermöglichte eine Vervielfältigung der DNA entsprechend einer Polymerasekettenreaktion und zusätzlich eine Bestimmung der Menge der amplifizierten Sequenz. Mit Hilfe eines β -Aktin-Primers konnte so die quantitative Übereinstimmung der Proben überprüft werden, bevor die Standard-PCR durchgeführt wurde. Die Quantifizierung erfolgte durch Messung von Fluoreszenz-Signalen. Die Fluoreszenz nahm proportional der Menge der PCR-Produkte zu. Die Signale wurden während eines PCR-Zyklus in Echtzeit erfasst. So konnte bereits während der einzelnen Schritte der Kettenreaktion die Anzahl der DNA-Kopien errechnet werden. Die ABI-7500-Fast-Software quantifizierte Fluoreszenz-Signale während der exponentiellen Phase der PCR, in der sich die Menge an DNA-Templaten bei jedem Zyklus annähernd verdoppelte. Hierfür wurden spezielle fluorogene Sonden eingesetzt. Diese bestehen aus einem zur Template-DNA komplementären Nukleotid. Diese TaqMan-Sonden können mit einem mittleren Bereich der Template-DNA hybridisieren. Das 5' Ende ist mit einem fluoreszenten Reporterfarbstoff markiert, während an das 3' Ende ein Quencher-Farbstoff gekoppelt ist. Durch die räumliche Nähe von Reporter und Quencher wird die Fluoreszenz des Reporters unterdrückt (Fluoreszenz Energietransfer nach Förster). Die Fluoreszenzlöschung durch den Quencher ist reversibel. Die Intensität der Fluoreszenz des Reporters steigt, sobald der Quencher entfernt wird. Da sich der Reporterfarbstoff auf der intakten Sonde im Einflussbereich des Quenchers befindet, wird bei einer Anregung durch eine Wellenlänge von 488nm keine Fluoreszenz gemessen. Im Rahmen der PCR kommt es zur Anlagerung von Primer und Sonde am Matrizenstrang. Während der Elongationsphase verlängert die Taq-Polymerase die Primer an ihrem freien 3'OH-Ende und baut mit ihrer 5'-3' Exonuklease-Aktivität die Sonde ab. Durch die Sondenhydrolyse wurden Reporterfarbstoff und Quencher voneinander getrennt. Der freigesetzte Reporterfarbstoff wurde am Ende jedes Zyklus detektiert. Nicht hybridisierte Sonden wurden nicht hydrolysiert. Auf diese Weise wurde die Fluoreszenz des Farbstoffs nur dann messbar, wenn die DNA-Polymerase tatsächlich den gewünschten Strang kopiert hatte. Jedes freigesetzte Molekül Reporterfarbstoff stand daher für einen synthetisierten DNA-Strang. Entsprechend der Akkumulation von PCR-Produkten stieg die Fluoreszenz des

Reporters mit jedem Zyklus an. Zur Ausführung der Real-Time-PCR wurden jeweils 1µl Primer-Mix, 8µl H₂O sowie 10µl iTaq-Fast-Supremix mit 1µl der oben gewonnenen c-DNA in sterile 96-Well-Platten pipettiert. Der Supremix enthält Taq-Polymerase, Puffer und Nukleotide. Die Emission des Reporterfarbstoffs wurde von der ABI-7500-Fast-Software quantifiziert und graphisch dargestellt.

Real-Time-PCR (einfacher Ansatz)

1µl	Primer-mix für Real-Time-PCR
10µl	iTaq-Fast-Supremix with Rox von BioRad
8µl	H ₂ O

2.6.4 Standard-PCR

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion können Nukleinsäuren exponentiell amplifiziert werden. Als Matrize diente die generierte c-DNA. Zu 1µl c-DNA wurden 1µl des gewünschten Primers als Primer-Mix, H₂O sowie PCR-Master-Mix zugegeben. Der Primer-Mix besteht aus Rückwärts- und Vorwärtsprimern. Es handelt sich dabei um 15-30 Basen lange, synthetische Oligodesoxyribonukleotide. Ihre Sequenz wurde so gewählt, dass sie komplementär zu der Sequenz jeweils eines Einzelstranges der zu vervielfältigenden DNA war und dass die Primer nach Anlagerung an die komplementäre DNA-Sequenz die zu vermehrende DNA-Sequenz zwischen sich einschließen. Der Master-Mix wurde in fertiger Form von Promega erworben und enthält u.a. die TaqDNA-Polymerase und Nukleotide (dNTPs). Die Taq-Polymerase ist eine thermostabile DNA-Polymerase, die ursprünglich aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* isoliert worden war.

Im verwendeten Thermocycler (Mastercycler von Eppendorf) konnte die gewünschte Zyklenzahl eingestellt werden. Für die Experimente wurden 25 bis 32 Zyklen verwendet. Der Mastercycler erhitzt und kühlt die in ihm befindlichen Reaktionsgefäße mit den Proben aus c-DNA und Master-Mix und gewährleistet so die Temperatur, die für den jeweiligen Schritt benötigt wird. Um Verdunstung zu

verhindern, wurden dicht schließende Reaktionsgefäße verwendet. Etwaige Kondensatbildung im Deckel der Gefäße wurde durch einen beheizbaren Gerätdeckel (über 100 °C) verhindert. Nachdem durch Verlängerung der Primer neue DNA-Doppelstränge entstanden waren, folgte ein weiterer Zyklus, wobei unter optimalen Bedingungen jeweils mit einer Verdopplung der gewünschten DNA-Sequenz zu rechnen war.

PCR (einfachen Ansatz)

1µl Primer-Mix (angesetzt aus 5µl Rückwärtsprimer, 5µl Vorwärtsprimer, 90µl H₂O)

12.5µl PCR-Master-Mix von Promega

1µl c-DNA

2.6.5 Theoretischer Ablauf PCR

Denaturierung: Zunächst wird die doppelsträngige DNA auf 94°C erhitzt, um die Stränge zu trennen. Die Wasserstoffbrückenbindungen, die die beiden DNA-Stränge zusammenhalten, werden so aufgebrochen. Es liegen nun Einzelstränge vor. Danach wird schnell auf 65°C abgekühlt, um die Rückbildung der Doppelhelix zu verhindern.

Primerhybridisierung: Die Temperatur wird ca. 60 Sekunden lang auf einem Wert von 57-63°C gehalten, was ein spezifisches Anlagern der Primer an die DNA erlaubt. Die genaue Temperatur wird durch die Länge und die Sequenz der Primer bestimmt. Wird die Temperatur zu niedrig gewählt, können sich die Primer unter Umständen auch an nicht-100%-komplementären Sequenzen anlagern und so zu unspezifischen Produkten führen. Wird die Temperatur zu hoch gewählt, ist die thermische Bewegung der Primer so groß, dass sie keine Anlagerung zulässt. So käme es zu gar keiner oder nur ineffizienter Produktbildung. Die Annealing-Temperatur hängt von der Basenzusammensetzung und der Länge der Primer ab. Je

höher der GC-Gehalt und eine damit verbundene höhere Anzahl an Wasserstoffbrückenbindungen, desto höher ist die günstige Annealing Temperatur.

Elongation: Die Elongation erfolgte bei 72°C. Die Primer werden an ihrem 3'Ende mit Hilfe der thermostabilen DNA-Polymerase und der dNTPs verlängert.

Initiale Denaturierung		94°C	5min
Quantifizierung	Denaturierung	94°C	1min
	Primerhybridisierung („Annealing“)	57°-63°C	1min
	Elongation	72°C	1min
Abkühlung		4°C	10min

Tabelle 3: Überblick über den Ablauf der PCR

2.6.6 Agarose-Gelelektrophorese

Das PCR-Produkt konnte durch eine Gelelektrophorese anhand seiner Größe identifiziert werden. Je 16µl einer Probe wurden mit 5µl Puffer (6x Mass-Ruler-Loading-Dye-Solution von Fermentas) versetzt und auf ein Agarose-Gel aufgetragen. Auf eventuell leere Spuren wurde 20µl H₂O gegeben. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes bewegte sich die aufgrund der Phosphatreste negativ geladene DNA in Richtung Anode. Das Agarose-Gel besteht aus vernetzten Agarose-Polymeren. Je höher die Agarosekonzentration ist, desto kleiner sind die gebildeten Poren. Kleinere DNA-Moleküle wanderten schneller durch das Gel. Es erfolgte somit eine Auftrennung der DNA nach Größe.

Der zugegebene Puffer enthielt einen blauen Farbstoff (Bromophenol-Blue), der die Migration der Proben während der Elektrophorese sichtbar machte. Die DNA konnte anschließend durch UV-Licht (254nm) auf dem Agarose-Gel mit dem Molecular-Imager-Gel-DocXR+ von BioRad sichtbar gemacht werden. Die Analyse erfolgte mit der Image Lab 2.0 Software. Die Länge des PCR-Produkts konnte durch einen Vergleich mit dem DNA-Marker bestimmt werden, der DNA-Fragmente bekannter Größe enthielt und parallel zu den Proben im Gel mitlief.

2.6.7 Verwendete Primer

Primer-Mix für Real-Time-PCR

biomers.net GmbH, Ulm, Deutschland

Gene	Forward primer	Reverse primer	PCR product (bp)	Cycles/ T _{ann}
HSPA1A	GTGACCTTCGACATCGATGCCAACG	CTGACCCAGACCCTCCCTTGGGAC	475	29/57° C
HSPA4	GAGGACCAGTATGATCATTGG	GTCTGAATCCGAAGGCACAGCTG	336	32/57° C
HSPA5 (BIP)	GCTGTAGCGTATGGTGCTGC	ATCAGTGTCTACAAC TCATC	794	29/57° C
HSPA8	CAACCATGTCCAAGGGACCTG	CCAAGGTAGGCTTCTGCAATTTCC	412	25/57° C
HSP90AA1	AACTCAGCCTTTGTGGAACG	GTCTACTTCTTCCATGCGTG	687	29/57° C
HSP90AB1	GGAGCGAGTGCGGAAACGGG	CATCCTCATCGCCCTCGAGA	650	29/57° C
HSPB1	GCAAGCACGAGGAGCGGCAG	CTTGGCGGCAGTCTCATCGGA	251	29/57° C
HMOX1	GGCCGGATGGAGCGTCCGCAAC	CATGGCATAAAGCCCTGCAGC	870	29/57° C
DNAJB1	CAACGTGAACTTTGGCCGCTC	GTGGGGACGTTCACTGTGCAGC	399	29/57° C
CHOP	CTGCAGAGATGGCAGCTGAGTC	TGCTTGGTGCAGATTCACCATTC	515	32/57° C
β-Aktin	GGAGAAGCTGTGCTACGTGC	CGCTCAGGAGGAGCAATGAT	366	32/57° C

Tabelle 4: Übersicht verwendete Primer

2.7 Immunfluoreszenzanalyse

2.7.1 Methodik

Nach der Trypsinisierung wurden jeweils 1000 Zellen der Linie OVCAR-3 auf 8-Well-Chamberslides angesetzt und nach Erreichen der gewünschten Zelldichte 6 Stunden mit 1µM Disulfiram/Kupfer behandelt. Daran anschließend wurden die Zellen mit 80%igem Ethanol 5 Minuten lang fixiert. Dann wurden die Zellen 2-3-mal mit PBS gewaschen. Nach 2-stündiger Inkubation mit Primärantikörpern gegen HSP70, HSP27 und p65/RelA (Verdünnung 1:400 in Nährmedium) wurden die Zellen erneut 2-3-mal mit PBS gewaschen. Dann wurde der entsprechende Sekundärantikörper (Verdünnung 1:500 in PBS) zugegeben. Es wurde darauf geachtet, die Antikörper vor UV-Strahlung zu schützen. Nach 45-minütiger Inkubation mit dem Sekundärantikörper wurden die Zellen wiederum 2-3-mal mit PBS und anschließend mit destilliertem Wasser zur Vermeidung von Salzkristallbildung gewaschen. Das Wasser wurde abgeschüttet und die Kammern wurden vom Objektträger entfernt. Das Einbettmedium wurde auf den Objektträger gegeben und dann mit einem Slide abgedeckt. Dieser Slide wurde vorsichtig abgesenkt, um die Bildung von Luftblasen zu vermeiden. Zur Darstellung der Aktinfilamente durch den fluoreszenten Farbstoff Phalloidin wurden OVCAR-3 Zellen 4 bzw. 8 Stunden mit 1µM Disulfiram/Kupfer behandelt und anschließend mit Phalloidin inkubiert. Die Detektion der Fluoreszenz erfolgte mit dem Axiophot Fluoreszenzmikroskop von Zeiss. Die Zellen wurden in 40-facher Vergrößerung fotografiert.

2.7.2 Verwendete Antikörper

Anti-HSP70 AK, monoklonal	SantaCruz, Heidelberg, D
Anti-HSP27 AK, monoklonal	SantaCruz, Heidelberg, D
P65/RelA AK, polyklonal	Cell Signaling Technology, Frankfurt, D
Bodipy® FL Phalloidin	Invitrogen, Karlsruhe, D
Alexa Fluor 488 anti-Maus AK	Dianova, Hamburg, D

2.8 MTT-Test

Mit Hilfe des MTT-Tests konnte der Anteil lebender Zellen nach Zugabe von Substanzen im Vergleich zu einer Kontrollprobe gemessen werden. Der MTT-Test beruht auf der Reduktion des gelben wasserlöslichen Farbstoffs 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid (MTT) in blau-violettes wasserunlösliches Formazan durch Redoxvorgänge in lebenden Zellen. Zur Versuchsdurchführung wurden Zellen in 96-Well-Platten angesetzt und über Nacht unter Zellkulturbedingungen inkubiert. Anschließend wurden die Ovariakarzinomzellen OVCAR-3, SKOV-3, OVMZ-30, OVMZ-31, OVMZ-37, OVMZ-38 insgesamt 72 Stunden lang mit ansteigender Konzentration von 0 μ M, 1 μ M, 2 μ M, 3 μ M, 4 μ M und 5 μ M Disulfiram als Monosubstanz behandelt bzw. jeweils in Kombination mit 1 μ M Kupferchlorid. Zur Darstellung der Sensitivität der Mammakarzinomzelllinien MCF-7 und MB-231 gegenüber Disulfiram/Kupfer bzw. Auranofin wurden die Zellen 72 Stunden lang mit ansteigender Konzentration Disulfiram/Kupfer (0, 125nM, 250nM, 375nM DSF/Cu) oder Auranofin (0, 0,25 μ M, 0,5 μ M, 0,75 μ M AUR) behandelt. Als Kontrolle wurden die Zellen unbehandelt mit frischem Medium inkubiert. Nach 48 Stunden wurde das Medium auf den Kontrollzellen bzw. das Medium mit den Substanzen entfernt und jeweils durch frisches Medium in gleicher Zusammensetzung pro Well ersetzt, um Zelltod durch eine verminderte Qualität des Nährmediums auszuschließen. Danach wurden pro Well jeweils 20 μ l von MTT in einer Konzentration von 5mg/ml in PBS hinzugegeben und für eine weitere Stunde im Brutschrank inkubiert. Der lösliche MTT-Farbstoff wurde dabei von den lebenden Zellen in unlösliche violette Farbkristalle umgewandelt. Nach Zugabe von 100 μ l DMSO wurde die Überlebensrate der Zellen mittels ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 595nm ermittelt.

3 Ergebnisse

3.1 Analyse der zytotoxischen Eigenschaften verschiedener Substanzen auf Ovarialkarzinomzellen

Zuerst wurde im Rahmen eines Vorabscreenings an den Zelllinien OVCAR-3, SKOV-3, OVMZ-30, OVMZ-31, OVMZ-37 und OVMZ-38 verschiedene potentiell antitumoral wirkende Substanzen getestet. Die Zellen wurden in vitro mit den folgenden Substanzen behandelt: Disulfiram (ALDH-Inhibitor), Kupfer (Metallion) sowie Auranofin (organische Goldverbindung). Die Substanzen wurden in verschiedenen Konzentrationen getestet und mit Hilfe des Zellkulturmikroskops bewertet. Ferner wurde nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden der Einfluss des Medikaments jeweils durch Anfärben der Zellen makroskopisch sichtbar gemacht, um einen Überblick über die Gesamtpopulation zu gewinnen. Bei einer Zugabe von Disulfiram und Kupfer - jeweils in Konzentration bis $1\mu\text{M}$ - konnten kaum Veränderungen des Zellwachstums durch die jeweilige Monosubstanz festgestellt werden. Die Kombination von Disulfiram ($1\mu\text{M}$) und Kupfer ($1\mu\text{M}$) führte nach einer Inkubation von 24 Stunden zum massiven Zelltod. Im Mikroskop zeigten sich abgerundete, vom Boden der Zellkulturschale abgelöste Zellen. Auranofin hatte bis zu einer Konzentration von $2\mu\text{M}$ keinen Einfluss auf die Zellen des Ovarialkarzinoms. Jedoch konnte durch die Behandlung der Zellen mit Auranofin eine Verstärkung des Effekts der Kombinationstherapie aus Disulfiram und Kupfer erreicht werden

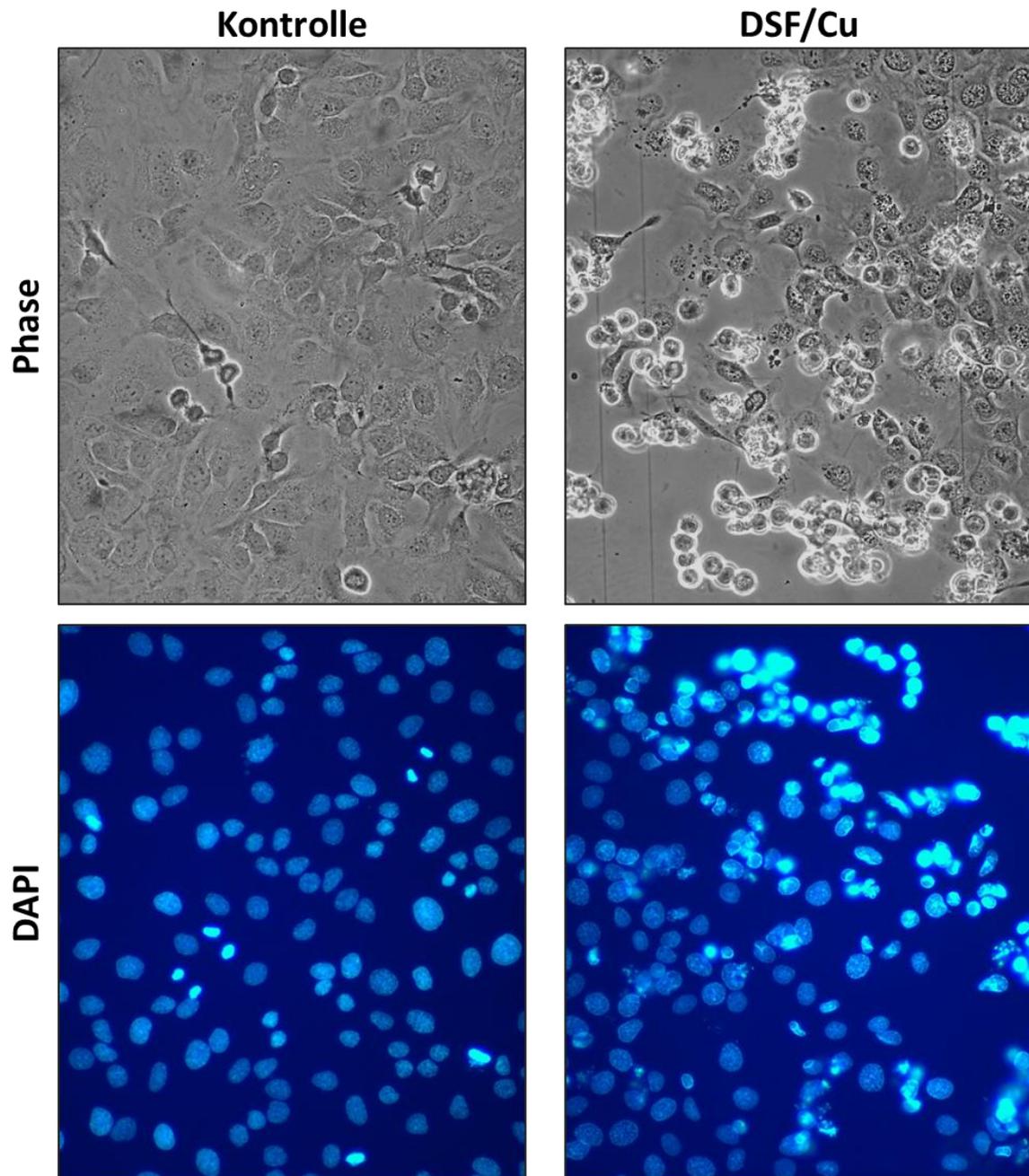


Abbildung 8: Darstellung der veränderten Zellstruktur durch den Einfluss von Disulfiram/Kupfer: Die Zellen der Linie OVCAR-3 wurden 6h mit 1 μ M Disulfiram/Kupfer (DSF/Cu) inkubiert.

3.2 Der zytotoxische Effekt von Disulfiram in Abhängigkeit von Kupfer

Die in der Zellkultur beobachtete Wirkung von Disulfiram und Kupfer wurde durch eine kolorimetrische Messung der Zellviabilität in einem MTT-Test genauer analysiert. Der Anteil lebender Zellen wurde nach 72-stündiger Inkubation mit Disulfiram in den Konzentration 0, 1, 2, 3, 4 und 5 μM gemessen. Alle Zelllinien zeigten im Vergleich zur Kontrolle ab einer Disulfiramkonzentration von 1-2 μM ein reduziertes Überleben. Auffallend war insbesondere bei den Zelllinien OVCAR-3, SKOV-3, OVMZ-30 und OVMZ-38 eine biphasische Überlebenskurve mit reduziertem Zellwachstum bei einer Optimumskonzentration von 1-2 μM Disulfiram. Bei den Zelllinien OVCAR-3 und SKOV-3 wurde die Zahl lebender Zellen ab einer Konzentration von 2 μM Disulfiram um mehr als 50% reduziert. Verminderte Sensitivität gegenüber Disulfiram bis zu einer Konzentration von 5 μM wurde bei der Zelllinie OVMZ-31 festgestellt. Die Zellen der Linie OVMZ-37 zeigten bereits nach der Behandlung mit 1 μM Disulfiram als Monosubstanz kaum Zellüberleben. Wenn die Zellen im MTT-Test mit einer Kombination aus Disulfiram in aufsteigender Konzentration und jeweils 1 μM Kupfer behandelt wurden, konnte eine Abnahme des Überlebens in allen Zelllinien dokumentiert werden. Dabei war aufgrund des bereits massiv auftretenden Zelltods der verstärkt toxische Effekt durch die Zugabe von Kupfer unabhängig von der Höhe der Disulfiramkonzentration (siehe Abbildung 9). Bei der Zelllinie OVMZ-38 und bedingt auch bei OVMZ-31 konnte aber wiederum ein Ansatz zu einem biphasischen Ansprechen beobachtet werden.

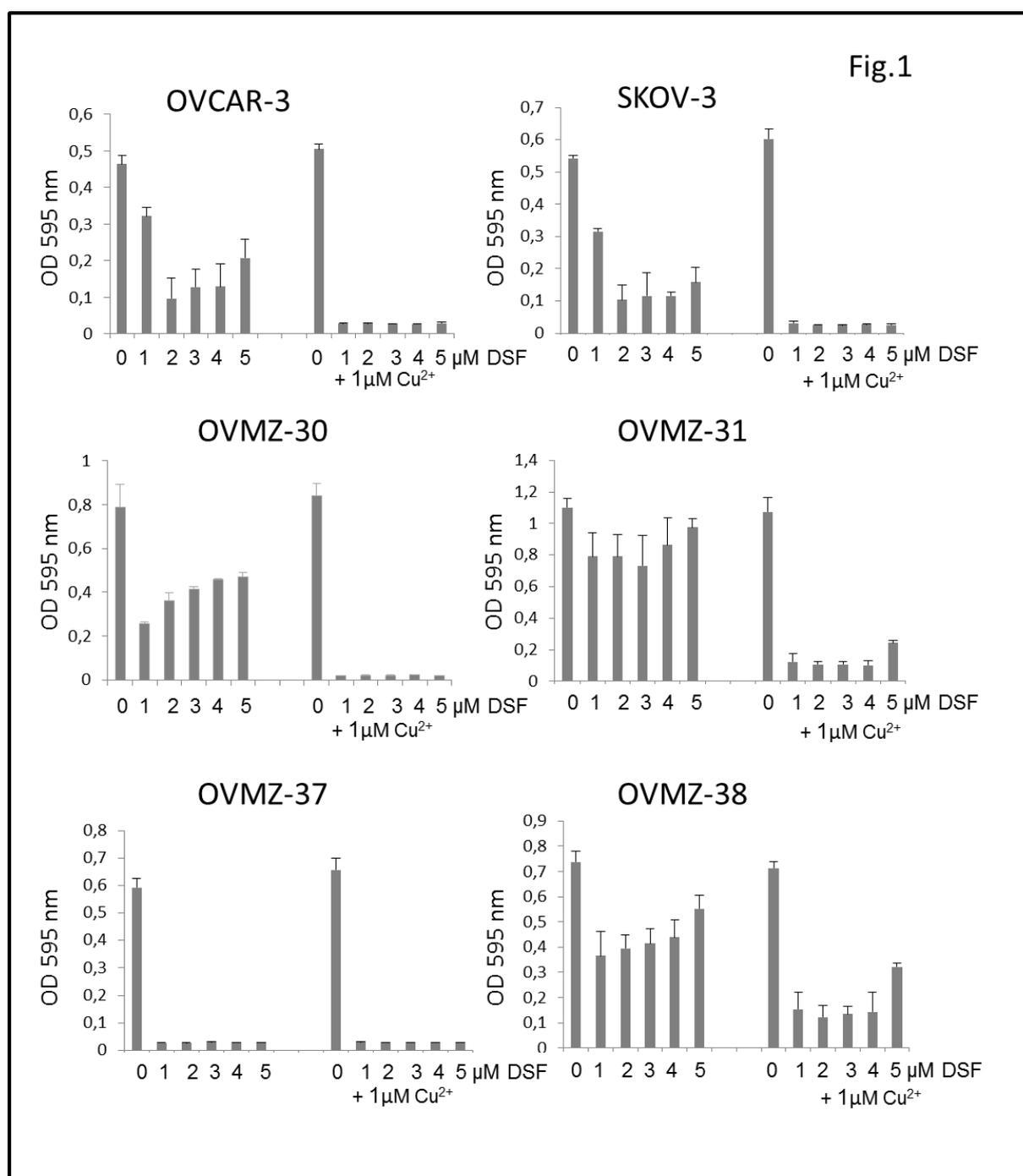


Abbildung 9: MTT-Test: Darstellung des Zellüberlebens und die Sensitivität der verschiedenen Ovariakarzinomzelllinien gegenüber Disulfiram bzw. der Kombination aus Disulfiram und Kupfer. Die Zellen wurden 72h lang mit Disulfiram (DSF) in ansteigender Konzentration von 0μM-5μM als Monosubstanz behandelt oder in Kombination mit 1μM Kupferchlorid (Cu²⁺).

3.2.1 Apoptose-Induktion und Hitzeschockreaktion der Zelle nach der Behandlung mit Disulfiram und Kupfer

Um den Wirkmechanismus von Disulfiram und Kupfer auf zelluläre Mechanismen genauer zu untersuchen, wurden die Zelllinien OVCAR-3 und SKOV-3 ausgewählt. Bei beiden Zelllinien ist im MTT-Test eine Reduktion des Zellüberlebens ab einer Konzentration von 2µM Disulfiram um mehr als 50% zu beobachten. Die Applikation von Kupfer führt konzentrationsunabhängig zum Zelltod. Nach Zugabe von 1µM Disulfiram ist bei den Zelllinien OVCAR-3 und SKOV-3 das Zellüberleben nur leicht reduziert, sodass in den weiteren Untersuchungen der Einfluss der Kombinationstherapie im Konzentrationsbereich 1µM klar herausgearbeitet werden kann. Die Zellen der Linien OVCAR-3 und SKOV-3 wurden mit Disulfiram (1µM), Kupferchlorid (1µM) sowie einer Kombination beider Substanzen für 24 Stunden behandelt. Die gebildeten Zelllysate wurden dann im Western Blot analysiert. Allgemein wird der Nachweis von PARP-Spaltung im Western Blot häufig als Indikator ablaufender Apoptose genutzt (Boulares et al., 1999). Der Immunblot zeigte bei den Zellen, die entweder mit Disulfiram oder Kupfer behandelt wurden, keine PARP-Spaltung. Die Zellen, die mit der Kombination aus Disulfiram und Kupfer behandelt wurden, zeigten dagegen eine klare PARP-Spaltung. Gleichzeitig konnte in den Zellen, die mit der Kombination aus Disulfiram und Kupfer behandelt wurden, eine Herunterregulation des antiapoptotisch wirkenden Proteins mcl1 beobachtet werden (Fu et al., 2011; Inoshita et al., 2002). Die proapoptotisch wirkende c-Jun N-terminale Kinase (JNK) wurde in ihrer nicht phosphorylierten Form gleichmäßig in allen Proben exprimiert. Die Ovarialkarzinomzellen, die mit einer Kombination aus Disulfiram und Kupfer behandelt wurden, zeigten nach 24-stündiger Inkubation eine Phosphorylierung von JNK, was auf eine Aktivierung der JNK durch Disulfiram und Kupfer hinweist. Im Weiteren wurde der Einfluss von Disulfiram und Kupfer auf Hitzeschockproteine gezeigt. Wie oben beschrieben werden HSPs unter Stressbedingungen wie Hitze, reaktive Sauerstoffspezies (reaktive oxygen species, ROS) oder zytostatischer Therapie vermehrt exprimiert. Diese Überexpression erlaubt der Zelle die schädigenden Umwelteinflüsse zu überstehen (Garrido et al., 2003). Mit Disulfiram und Kupfer behandelte Zellen zeigten eine deutlich vermehrte Expression des stressinduzierbaren HSP70 (Guo et al., 2007). Je länger die Zellen mit Disulfiram und Kupfer inkubiert worden waren, desto ausgeprägter wurde das

Hitzeschockprotein hochreguliert (siehe Abbildung 10C). Diese vermehrte Synthese von HSP70 wird durch schädigende Einflüsse auf die Zelle induziert und durch den Hitzeschockfaktor 1 (HSF1) reguliert (Goloudina et al., 2012). Die Induktion von HSF1 durch oxidativen Stress (Anckar und Sistonen, 2011) erfolgte über die Hyperphosphorylierung des Hitzeschockfaktors (Kline und Morimoto, 1997). In den mit Disulfiram/Kupfer behandelten Zellen zeigte der Hitzeschockfaktor 1 ein erhöhtes Molekulargewicht im Vergleich zur Kontrolle und zu den mit den Monosubstanzen behandelten Zellen. Das erhöhte Molekulargewicht wurde am ehesten durch die Hyperphosphorylierung verursacht und zeigte somit eine Aktivierung des HSF1 durch Disulfiram und Kupfer. In den Zellen, die mit der Kombination aus Disulfiram und Kupfer behandelt wurden, erschien die Expression des Hitzeschockproteins 27 nur wenig verändert. Eindeutig war jedoch festzustellen, dass die Kombinationstherapie eine Induktion des phosphorylierten HSP27 verursacht. Bei den Zellen, die jeweils nur mit Disulfiram und Kupfer als Monosubstanz behandelt worden waren, wurde HSP27 nicht phosphoryliert. Neben der Phosphorylierung von HSP27 unter dem Einfluss der Kombinationsbehandlung zeigte die Analyse der Expression von HSP27 unter nicht-reduzierenden Bedingungen (d.h. ohne Mercaptoethanol) sehr deutlich den wohl durch die Phosphorylierung verursachten Übergang der monomeren Form des HSP27 zu einer dimeren (Bruey et al., 2000). Die Western Blot Analyse weist auch auf eine mögliche Degradation des NFκB Inhibitors IκB hin (Abb. 9A, 24h), obwohl eigentlich aufgrund der Beschreibung von Disulfiram/Kupfer als Proteasominhibitor eine Akkumulation erwartet wurde. Tatsächlich zeigte sich nach kurzfristiger Inkubation bei OVCAR-3 Zellen auch eine erhöhte Expression von IκB, die bei längeren Inkubationszeiten jedoch wieder abnahm und auch zum Teil sehr stark variierte.

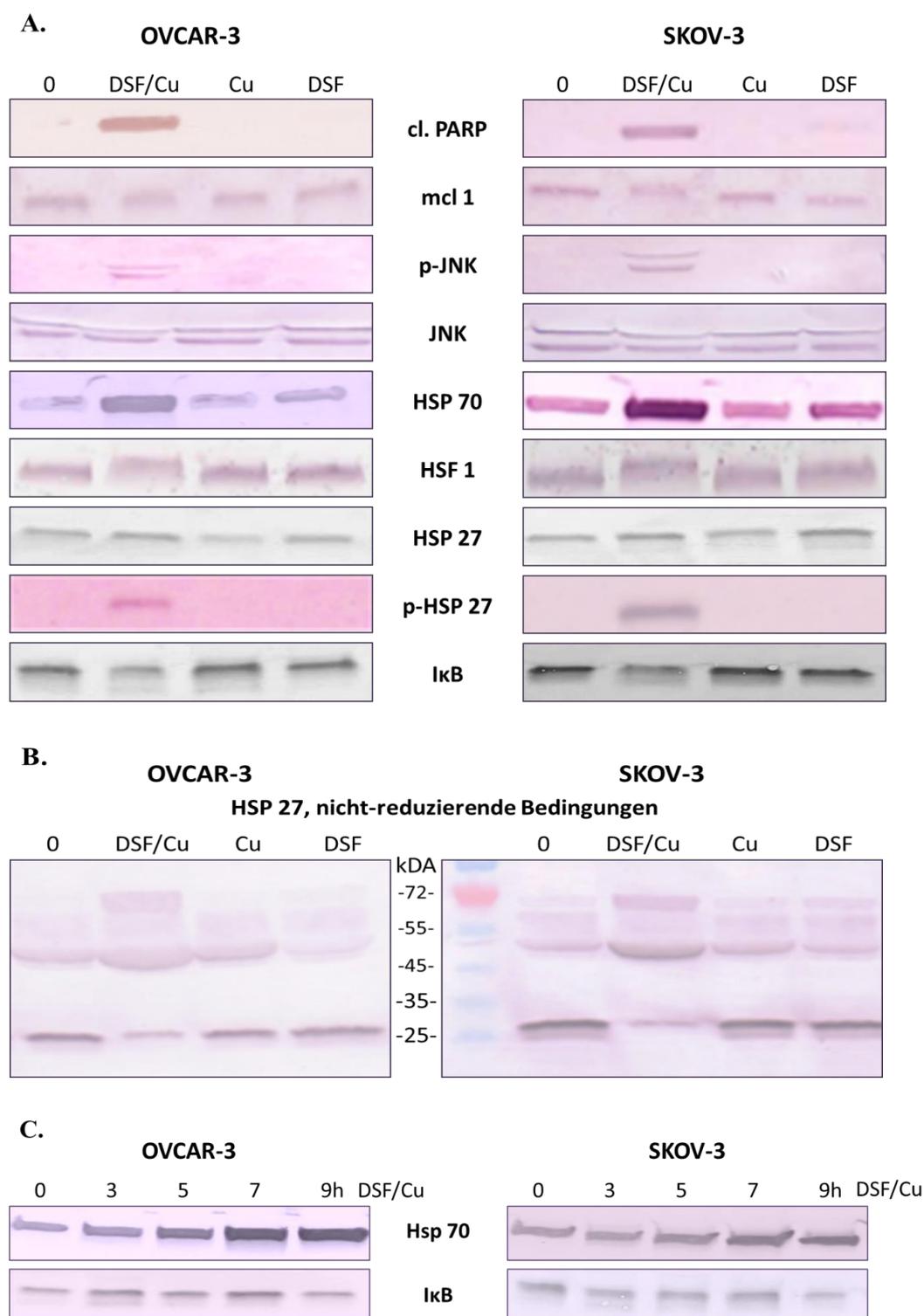


Abbildung 10: Darstellung der Hitzeschockreaktion im Western Blot: Zellen der Linie OVCAR-3 und SKOV-3 wurden für 24 h mit 1µM Disulfiram (DSF), 1µM Kupferchlorid (Cu) oder mit einer Kombination aus jeweils 1µM Disulfiram und 1µM Kupfer (DSF/Cu) behandelt. Die Zelllysate wurden unter reduzierenden Bedingungen (Abbildung 10A) analysiert, um unter reduzierenden Bedingungen (Abbildung 10A) arbeiten zu können, wurde ein Mercaptoethanol enthaltender Puffer verwendet. Für nicht-reduzierende Bedingungen wurde ein Puffer ohne Mercaptoethanol verwendet. (Abbildung 10B). Um den Einfluss von DSF/Cu zeitabhängig beurteilen zu können, wurden die Zellen der Linie OVCAR-3 und SKOV-3 über 3, 5, 7, bzw. 9h mit 1µM DSF/Cu behandelt (Abbildung 10C). Die Zelllysate wurden dann im Western Blot analysiert.

3.2.2 ER-Stress und Akkumulation von polyubiquitinierten Proteinen durch die Kombinationstherapie

Die mit Disulfiram und Kupfer behandelten Zellen zeigten im Western Blot eine vermehrte Proteinubiquitinierung, was auf Proteasominhibierung in der Zelle hinweist (Oh et al., 2013). Nach 24-stündiger Inkubation mit der Kombinationstherapie aus Disulfiram und Kupfer wurde zudem eine Hochregulation vom BIP (GRP 78), einem Chaperon des Endoplasmatischen Retikulums, festgestellt. Dies weist auf eine Stressinduktion des Endoplasmatischen Retikulums durch Disulfiram und Kupfer hin (Bertolotti et al., 2000; Lee, 2001; Shen et al., 2002). Proteasominhibierung und ER-Stress sind häufig gekoppelt (Obeng et al., 2006).

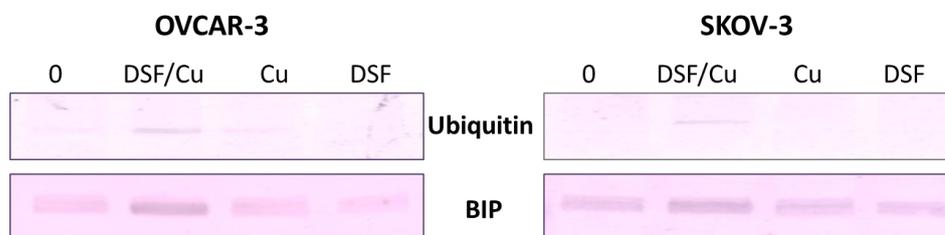


Abbildung 11: Western Blot: Zellen der Linie OVCAR-3 und SKOV-3 wurden für 24 h mit 1 μ M Disulfiram (DSF), 1 μ M Kupferchlorid (Cu) oder mit einer Kombination aus jeweils 1 μ M Disulfiram und 1 μ M Kupfer (DSF/Cu) behandelt. Die Zellysate wurden dann im Western Blot analysiert. Bei Ubiquitin wurde eine nicht näher spezifizierte, aber auffallende Bande im höheren Molekulargewichtsbereich zur Präsentation selektiert.

3.2.3 Transkriptionelle Induktion von Hitzeschockproteinen durch Disulfiram und Kupfer als frühes Ereignis

Im Western Blot war die Regulation von Hitzeschockproteinen auf Ebene der Proteinexpression beobachtet worden. In der PCR konnte in den Zellen der Ovarialkarzinomlinien OVCAR-3 und SKOV-3 eine transkriptionelle Induktion von Hitzeschockproteinen festgestellt werden. Die Zellen wurden mit 1µM Disulfiram in Kombination mit 1µM Kupfer für die Dauer von 3 bzw. 6 Stunden behandelt, um den Einfluss der Substanzen auf die Hitzeschockreaktion zeitabhängig beurteilen zu können. Die konstante Expression des „housekeeping“ Gens β -Aktin (Greer et al., 2010) in allen Proben zeigte die Vergleichbarkeit der untersuchten Zelllysate in der PCR. Im Western Blot konnte eine starke Induktion von HSP70 gezeigt werden aber die Antikörper richteten sich dabei gegen die strukturell ähnlichen Untergruppen der HSP70-Familie und es konnte nicht zwischen den einzelnen Isoformen unterschieden werden. Teile der HSP70 Familie sind stressinduzierbare, andere konstitutiv exprimierte Untereinheiten (Vos et al., 2008). Das menschliche Genom codiert 13 verschiedene Proteine der HSP70 (HSPA) Familie (Brocchieri et al., 2008; Qiu et al., 2006). HSPA1 (HSP72, iHSP70) ist das am stärksten stressinduzierbare Mitglied der HSP70 Familie (Fourie et al., 2001). Die PCR zeigt eine massive Induktion von HSPA1 bereits nach einer Inkubationszeit mit Disulfiram/Kupfer von 3 Stunden. In den Zellen der Ovarialkarzinomzelllinien OVCAR-3 und SKOV-3 wird HSPA4 durchgehend stark exprimiert und nicht durch eine Behandlung der Zellen mit Disulfiram und Kupfer reguliert. HSPA8 als „housekeeping“ Mitglied der HSP70-Familie (Fourie et al., 2001) wird durch den Einfluss von Disulfiram und Kupfer dagegen vermindert exprimiert. Im Western Blot konnte eine Hochregulation von BIP nach einer 24-stündigen Inkubation mit Disulfiram und Kupfer gezeigt werden. Auf transkriptioneller Ebene zeigte sich jedoch bis zu einer Inkubationszeit von 6 Stunden keine Regulation von HSPA5 (BIP). Wie einleitend bereits erläutert, reguliert das Ko-Chaperon DNAJB1 die ATPase-Aktivität von HSP70 und damit die Affinität von HSP70 für Proteine im Rahmen der Hitzeschockreaktion (Vos et al., 2008; Qiu et al., 2006). DNAJB1 (HSP40) kooperiert dabei mit HSPA1, einer weiteren Unterform der HSP70 Familie (Michels et al., 1997). Entsprechend zeigt sich nach einer 3-stündigen Inkubation mit Disulfiram und Kupfer in der PCR eine ausgeprägte Hochregulation von HSPA1 bei gleichzeitiger Induktion von DNAJB1. Die Expression von HSP90 α und HSP90 β unterscheidet sich nicht wesentlich nach der Behandlung

von Disulfiram und Kupfer. Als weiterer Hinweis auf eine frühzeitige Stressinduktion ist bei der Zelllinie OVCAR-3 bereits nach einer Inkubation mit Disulfiram und Kupfer über 3 Stunden eine ausgeprägte Induktion von HMOX1 auf transkriptioneller Ebene zu sehen. HMOX1 wird durch Stimuli wie Wasserstoffperoxid, UV-Licht und Hypoxie induziert (Ryter et al., 2006). Auch im Endoplasmatischen Retikulum wurde eine frühe Stressreaktion festgestellt, da in beiden Zelllinien bereits nach einer 3-stündigen Inkubation mit Disulfiram/Kupfer eine leicht vermehrte Expression des proapoptotischen Faktors CHOP (Healy et al., 2009) beobachtet werden konnte.

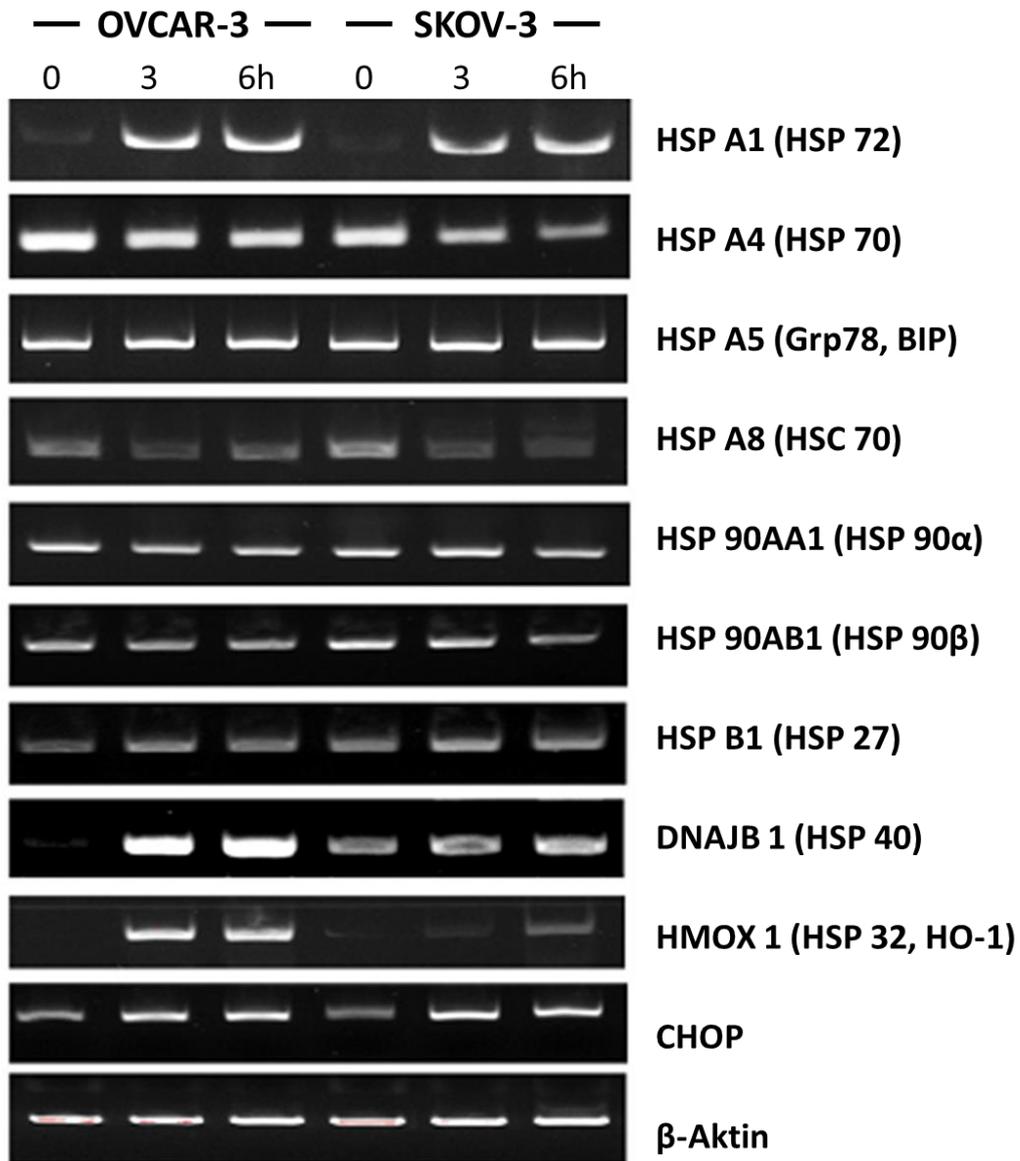


Abbildung 12: Darstellung der Hitzeschockreaktion in der PCR: Zellen der Linie OVCAR-3 und SKOV-3 wurden für 3h bzw. 6h mit der Kombination aus jeweils 1µM Disulfiram und 1µM Kupfer (DSF/Cu) behandelt.

3.2.4 Einfluss von Disulfiram/Kupfer auf die subzelluläre Verteilung von HSP27 und HSF1

3.2.4.1 Darstellung der subzellulären Verteilung der Hitzeschockfaktoren anhand von Zellfraktionierung

Um den Einfluss der Kombinationsbehandlung aus Disulfiram und Kupfer genauer definieren zu können, wurde eine grobe Trennung der zytosolischen und nukleären Fraktion durchgeführt. Diese Auftrennung erlaubt eine Beurteilung der subzellulären Verteilung von Stressfaktoren vor und nach 8-stündiger Behandlung mit Disulfiram und Kupfer im Western Blot. GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat) ist als Enzym der Glykolyse im Zytosol einer Zelle zu finden (Rassow et al., 2008) und wurde im Western Blot als zytosolischer Marker verwendet. Als Marker für die nukleäre Fraktion wurde der Transkriptionsfaktor MTA2 eingesetzt (Toh und Nicolson, 2009). Die ausgeprägte Induktion von HSP70 durch Disulfiram/Kupfer konnte erneut bestätigt werden. Die subzelluläre Verteilung von HSP70 zeigte sich vor und nach Induktion des Hitzeschockproteins unverändert. In der immunchemischen Analyse der Rohlysate der Ovarialkarzinomzellen wurde ein vermehrtes Vorkommen von HSP27 in der zytosolischen Fraktion der unbehandelten Zellen beobachtet. Nach der Behandlung mit Disulfiram und Kupfer wurde keine erhöhte Expression von HSP27 beobachtet. Dies entspricht den Ergebnissen in Abbildung 10A. Allerdings war die Expression von HSP27 in der nukleären Fraktion nach Behandlung mit Disulfiram und Kupfer klar erhöht. Deutlich sichtbar verschob sich nach der Behandlung der Zellen mit Disulfiram/Kupfer ein Teil des durch oxidativen Stress induzierbaren HSF1 (Mercier et al., 1999; Vujanac et al., 2005) aus der zytosolischen in die nukleäre Fraktion. Des Weiteren konnte in der Immunblotanalyse die Untereinheit p65 (Rel A) des antiapoptotisch wirkenden NF- κ B und sein Inhibitor I κ B (Karin und Ben-Neriah, 2000) in der zytosolischen Fraktion nachgewiesen werden. Auch nach der Behandlung mit Disulfiram/Kupfer fand keine Verschiebung von I κ B oder p65 in die nukleäre Fraktion statt.

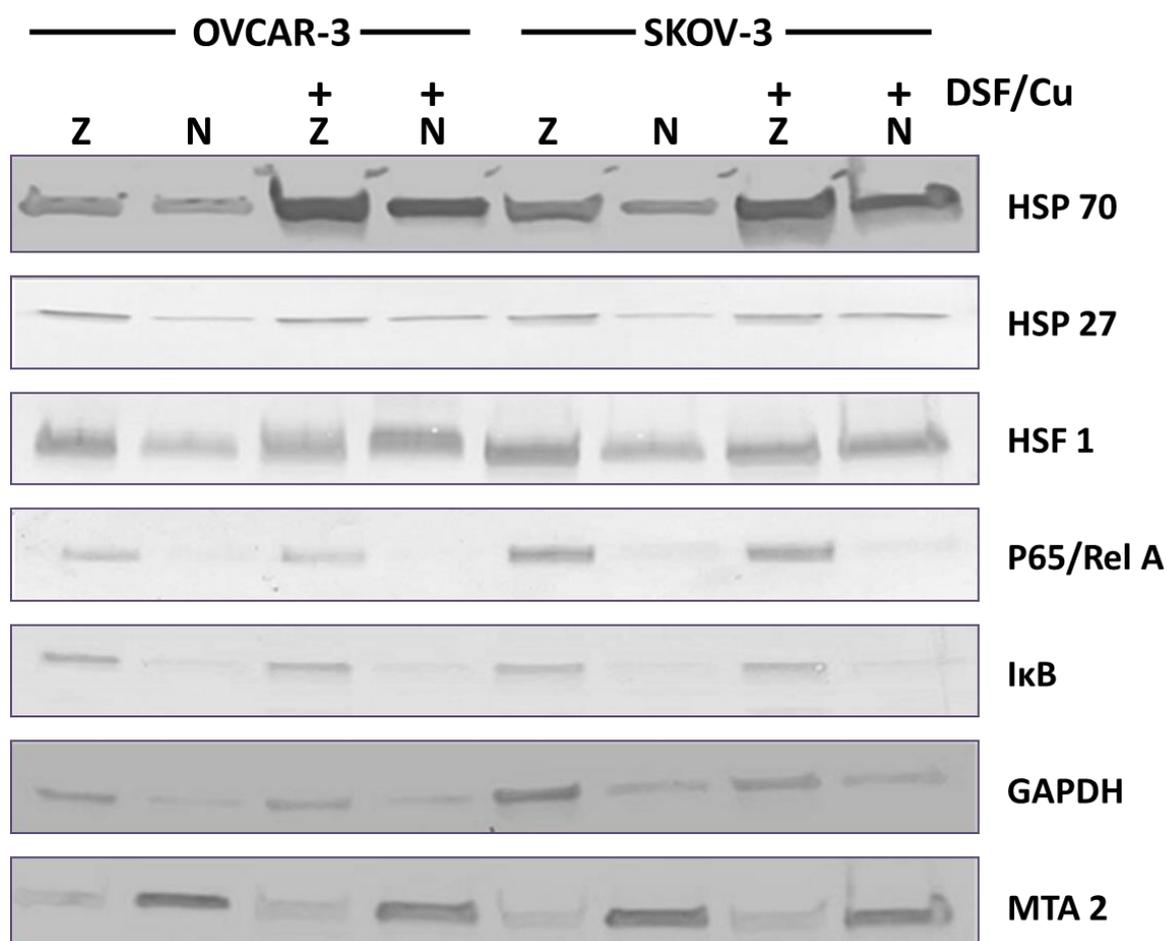


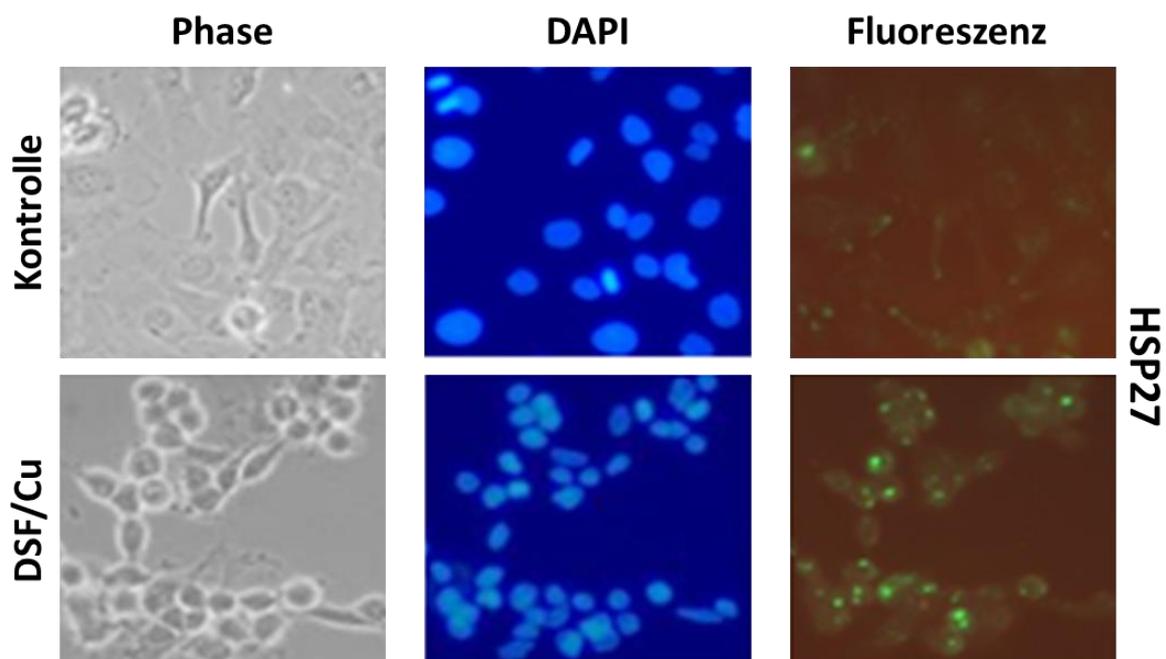
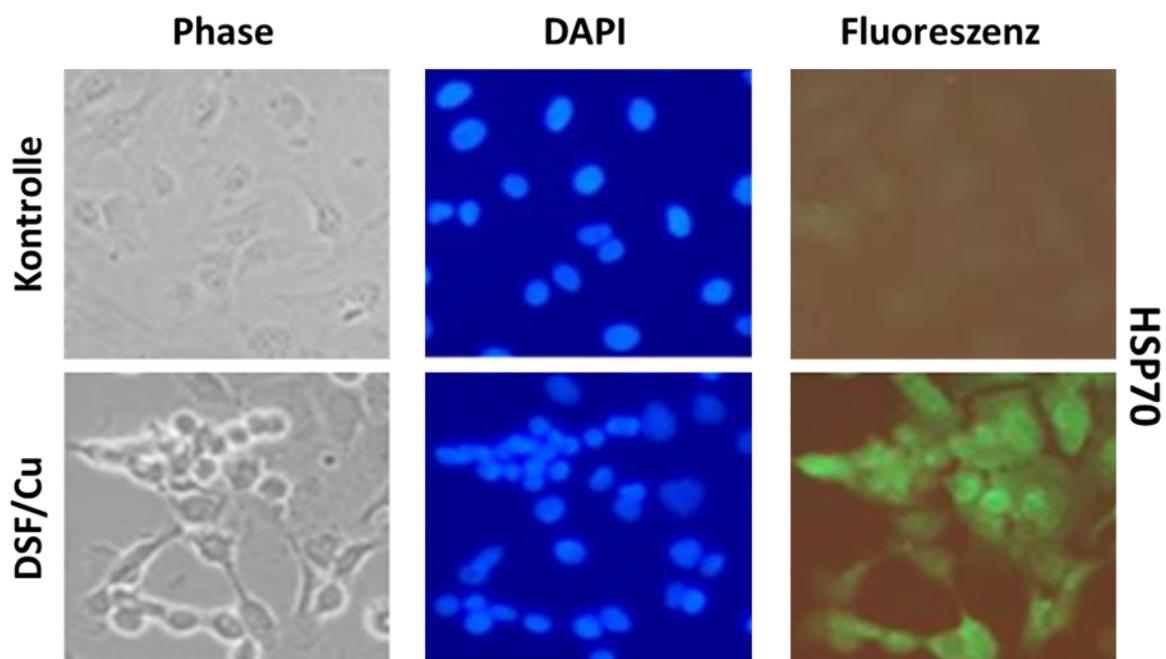
Abbildung 13: Darstellung der subzellulären Verteilung von Hitzeschockfaktoren: Zellen der Linien OVCAR-3 und SKOV-3 wurden für 8h mit 1μM Disulfiram/Kupfer behandelt. Durch Zellfraktionierung erfolgte eine grobe Trennung in die nukleäre (N) und zytosolische (Z) Fraktion. Die Zelllysate wurden anschließend im Western Blot analysiert. Dabei wurde GAPDH als Marker für die zytosolische Fraktion und MTA 2 für die nukleäre Fraktion verwendet.

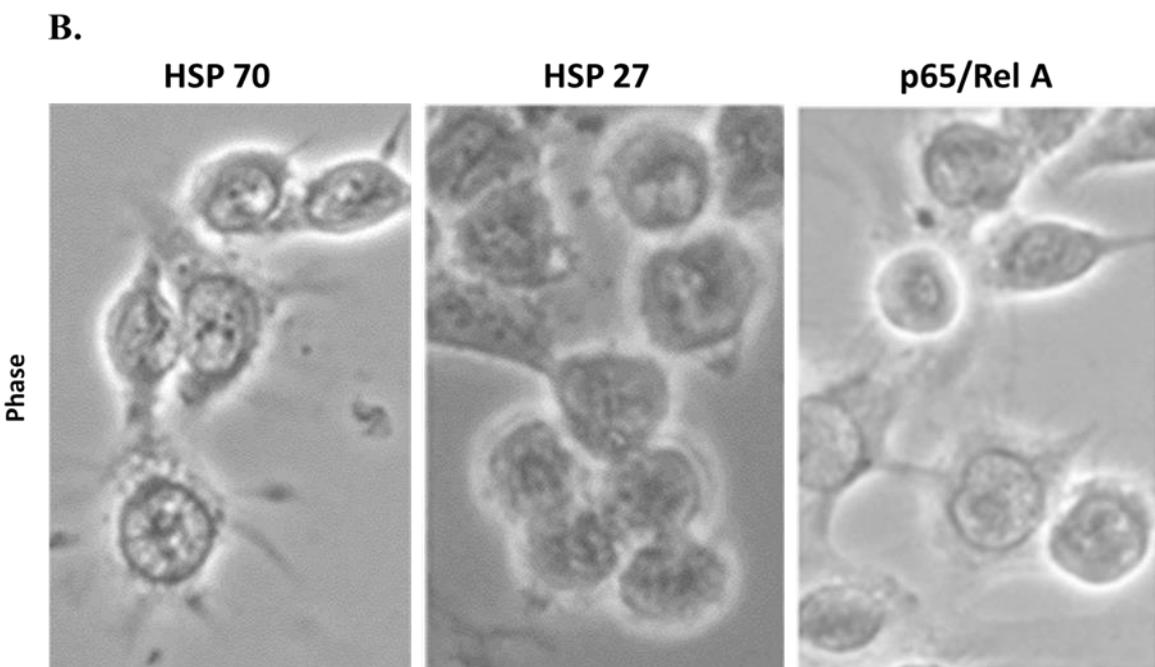
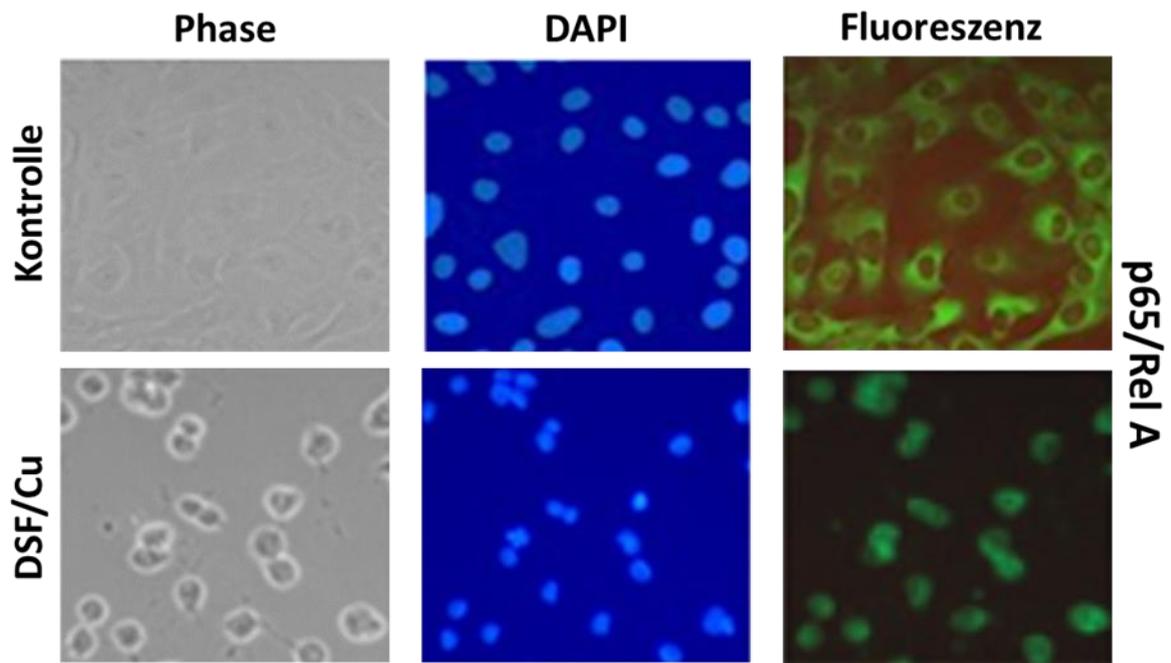
3.2.4.2 Immunhistochemische Darstellung der subzellulären Verteilung der Hitzeschockproteine

Um die subzelluläre Verteilung der Hitzeschockproteine zellmorphologisch zu untersuchen, wurden die Ovarialkarzinomzellen OVCAR-3 mittels Immunfluoreszenz analysiert. Hierzu wurden die Zellen 6 Stunden lang mit der Kombination aus 1µM Disulfiram und 1µM Kupfer und anschließend mit Antikörpern gegen p65, HSP70 und HSP27 sowie fluoreszierenden Sekundärantikörpern inkubiert.

Gemäß dem Ergebnis im Western Blot konnte auch in der immunhistochemischen Analyse eine starke Expression von p65 (RelA) im Zytosol der Zellen gesehen werden. Die Behandlung mit der Kombination aus Disulfiram und Kupfer erzeugte weder eine Veränderungen der subzellulären Verteilung noch eine Änderung der homogenen Verteilung von p65 im Zytosol. Die Immunfluoreszenzanalyse von HSP70 bestätigte auch optisch eine ausgeprägte Hochregulation von HSP70 in den Zellen, die mit der Kombination aus Disulfiram und Kupfer behandelt worden waren. HSP70 erschien homogen in der Zelle verteilt. Dies entspricht den Ergebnissen aus der Western Blot Analyse, in der HSP70 nach der Zellfraktionierung sowohl in der zytosolischen als auch in der nukleären Fraktion gleichmäßig erhöht dargestellt wurde. Im Gegensatz zur Kontrolle zeigt HSP27 in den mit Disulfiram/Kupfer behandelten Zellen eine paranukleäre oder nukleäre Aggregatbildung von HSP27 in der Immunfluoreszenzanalyse.

A.





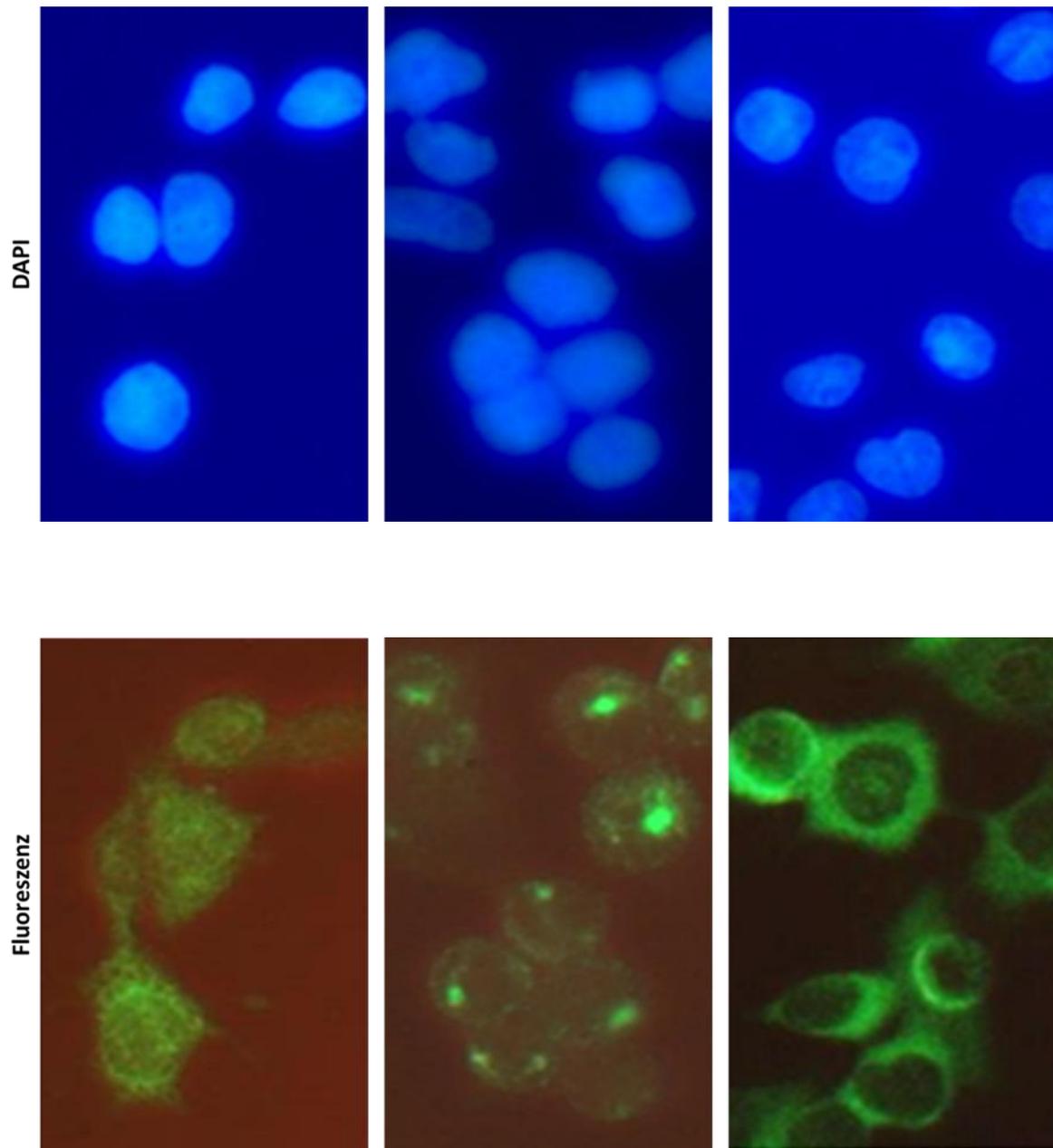


Abbildung 14: Darstellung der subzellulären Verteilung der Hitzeschockproteine unter Immunfluoreszenz: Zellen der Linie OVCAR-3 wurden 6h mit 1µM Disulfiram/Kupfer (DSF/Cu) inkubiert. Nach der Fixierung der Zellen mit Ethanol erfolgte die Applikation von Primärantikörpern gegen HSP70, HSP27 und p65/RelA sowie von entsprechenden Sekundärantikörpern. Die Zellen wurden in der Phasenkontrast- und Immunfluoreszenzmikroskopie dargestellt. A: Die Zellen wurden in 40-facher Vergrößerung fotografiert. B: Digital vergrößerte Ausschnitte der Darstellungen der Zellen nach der Behandlung mit Disulfiram/Kupfer.

3.2.5 Einfluss von Disulfiram/Kupfer auf die Stabilität des Zytoskeletts

HSP27 ist neben einer Vielzahl zellulärer Abläufe auch an der Regulation der Aktinfilamente des Zytoskeletts beteiligt (Mounier und Arrigo, 2002; Gusev et al., 2002; Sun und MacRae, 2005; Arrigo et al., 2007). So kann möglicherweise die im Mikroskop beobachtete Abrundung der Zellen nach der Behandlung mit Disulfiram/Kupfer unter anderem mit einer Inaktivierung von HSP27 erklärt werden. Um den vermuteten Einfluss von einer HSP27 Depletion auf das Zytoskelett genauer untersuchen zu können, wurden OVCAR-3 Zellen nach 4 bzw. 8-stündiger Inkubation mit Disulfiram/Kupfer mit Phalloidin behandelt, das mit einem grün fluoreszierenden Farbstoff verbunden ist und selektiv F-Aktin bindet. So konnten in den Zellen der Linie OVCAR-3 die Aktinfilamente unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden. In den Kontrollzellen zeigte sich ein dichtes, gleichmäßiges Netz aus stabilisierenden Aktinfilamenten unterhalb der Plasmamembran um den Nukleus angeordnet (siehe Abbildung 15). Bereits nach 4-stündiger Inkubation mit Disulfiram/Kupfer konnte eine massive Deformation der Zellstruktur und eine Aggregation von Aktinfilamenten in der Peripherie der Zelle beobachtet werden. Nach 8-stündiger Inkubation mit den Substanzen ist kaum noch eine Zellstruktur zu erkennen und die Aktinfilamente sind nur noch schwach färbbar.

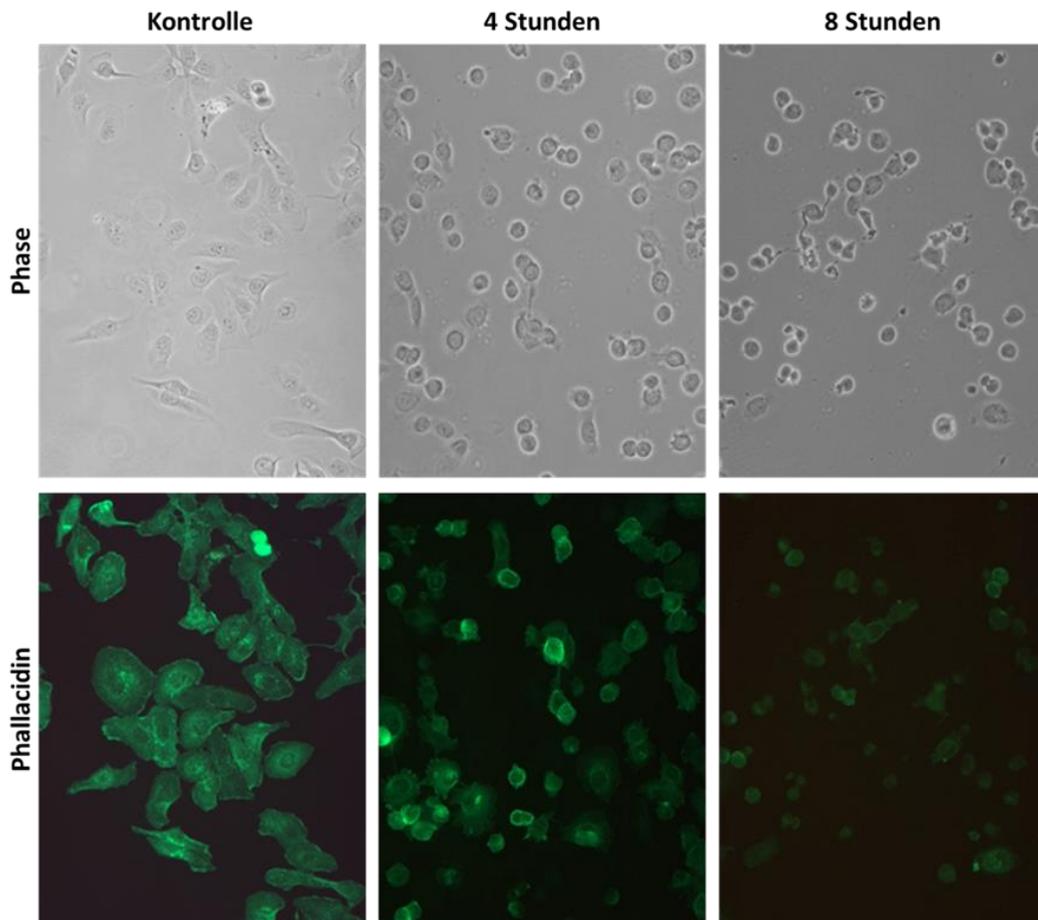


Abbildung 15: Darstellung der Aktinfilamente durch den fluoreszenten Farbstoff Phalloidin: OVCAR-3 Zellen wurden 4 bzw. 8h mit Disulfiram/Kupfer behandelt und anschließend mit Phalloidin inkubiert.

3.2.6 Einfluss von Disulfiram/Kupfer auf das langfristige Zellüberleben

Insgesamt konnte gut dargestellt werden, dass die mit der Kombination aus 1µM Disulfiram und Kupfer behandelten Zellen massivem Stress ausgesetzt sind, der zur Zellschädigung und Apoptose führte (PARP-Spaltung) und möglicherweise zu einer ER-Stress induzierten Apoptose (Induktion von CHOP). Disulfiram/Kupfer verursachte ebenfalls eine schnelle Abrundung der Zellen und Lösung vom Untergrund sowie eine Zerstörung des Zytoskeletts. Abschließend wurde evaluiert, ob die Zellen nach abgeschlossener Behandlung mit Disulfiram/Kupfer die Zellfunktion oder sogar die Integrität des Zytoskeletts wiederherstellen können, d.h. ob die Effekte reversibel sind. Erstaunlicherweise konnten trotz beobachteter PARP-Spaltung im Western Blot in der Immunhistochemie keine morphologischen Veränderungen gefunden werden, die eine Apoptose beweisen würden (das sog. „membrane blebbing“). Auch in der DAPI Färbung wurden keine Chromatinkondensate oder DNA-Fragmente als Zeichen der Apoptose (Wyllie et al., 1980) beobachtet. Deswegen wurde ein Versuch durchgeführt, das langfristige Zellüberleben und die Reversibilität der Zellschädigung zu untersuchen. OVCAR-3 und SKOV-3 Zellen wurden als adhärente Zellen 4 bzw. 8 Stunden lang mit 1µM Disulfiram/ Kupfer inkubiert. Anschließend wurden diese Zellen trypsinisiert und auf Zellkulturplatten übertragen. Nach 10 Tagen in Nährmedium und im Brutschrank zeigte sich, dass nach 4-stündiger Inkubation in Disulfiram/Kupfer einige wenige Zellen überlebten und in der Zellkultur erneut proliferieren konnten. Nach 8-stündiger Inkubation ist kein Zellwachstum mehr zu sehen, das heißt, man kann davon ausgehen, dass die Ovarialkarzinomzellen zu diesem Zeitpunkt irreversibel geschädigt waren.

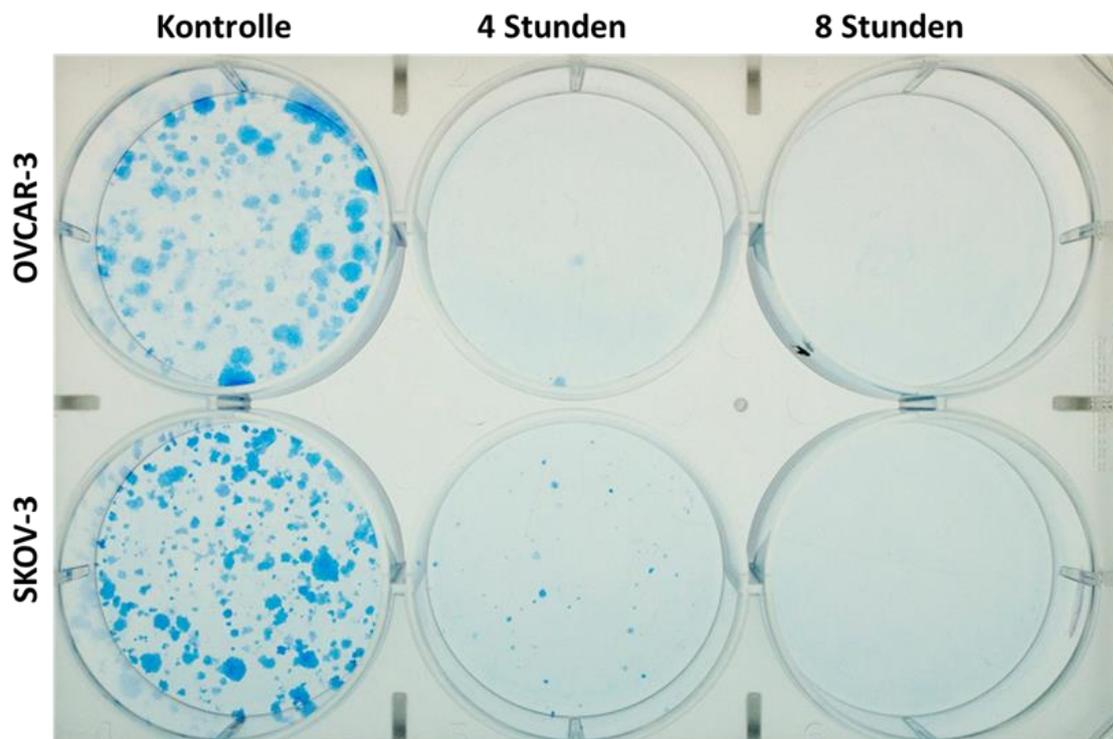


Abbildung 16: Darstellung der irreversiblen Zellschädigung durch Disulfiram/Kupfer: Zellen der Linie OVCAR-3 und SKOV-3 wurden in 24-Well-Platten angesetzt (10.000 Zellen/Well). Nach 4- bzw. 8h Inkubation mit 1 μ M Disulfiram/Kupfer wurden die Zellen durch Trypsinisierung gelöst und in einer Konzentration von 500 Zellen/Well auf eine 6-Well-Platte übertragen. Die Zellen wurden dann zur erneuten Proliferation über 10 Tage in der Zellkultur belassen. Anschließend wurden die Zellen mit Methanol fixiert und mit der Proteinfärbung gefärbt, um die unterschiedliche Zelldichte makroskopisch darzustellen.

3.3 Verstärkung des zytotoxischen Effekts von Disulfiram/Kupfer durch Auranofin

Auranofin ist eine Goldverbindung, die in der antirheumatischen Therapie eingesetzt wird und über eine Inhibition der Thioredoxinreduktase wirkt (Sánchez-Alcázar et al., 2001). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Auranofin die Wirksamkeit von Disulfiram/Kupfer auf Ovarialkarzinomzellen erhöht.

Zunächst wurde im Mikroskop eine vermehrte Abrundung und Ablösung der Ovarialkarzinomzellen durch die gleichzeitige Behandlung mit Auranofin und Disulfiram/Kupfer im Vergleich zur ausschließlichen Administration von Disulfiram/Kupfer beobachtet. Dieser Effekt konnte allerdings nur bei der Nutzung niedriger Konzentrationen Disulfiram/Kupfer beobachtet werden. Bei Konzentrationen über 500nM Disulfiram/Kupfer wurden alle Zellen bereits durch die alleinige Wirkung von Disulfiram/Kupfer geschädigt (Beobachtungen am Zellkulturmikroskop). In einem MTT-Test wurde darum das Zellüberleben von OVCAR-3 und SKOV-3 Zellen nach Zugabe von 125nM, 250nM bzw. 500nM Disulfiram/Kupfer gemessen. Wurden die Zellen zusätzlich mit 1µM Auranofin behandelt, konnte bei den OVCAR-3 Zellen ein vermindertes Zellüberleben dokumentiert werden. Bei den Zellen der Linie SKOV-3 zeigte sich ab einer Konzentration von 500nM Disulfiram/Kupfer ein synergistischer Effekt bei Zugabe von Auranofin.

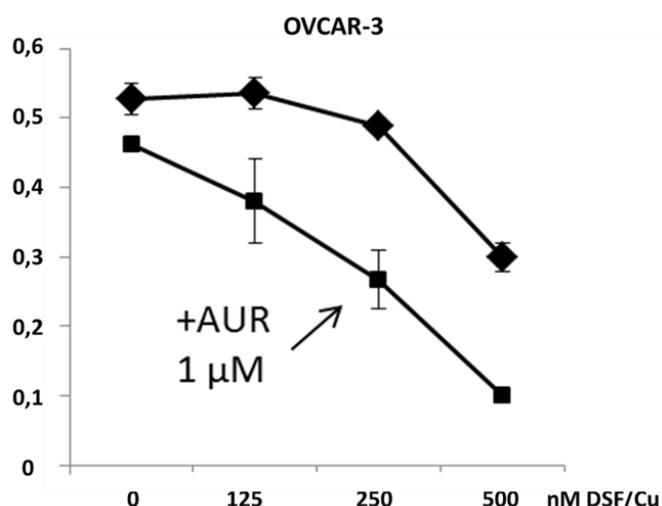


Abbildung 17: Grafische Darstellung der Wirksamkeit von Disulfiram/Kupfer/Auranofin: OVCAR-3 und SKOV-3 Zellen wurden 72h mit einer Kombination aus Disulfiram und Kupfer (DSF/Cu) behandelt. Es wurden Konzentrationen von jeweils 125nM, 250nM und 500nM in äquimolarem Verhältnis Disulfiram und Kupfer verwendet. Es wurde das Zellüberleben gemessen unter der alleinigen Zugabe von Disulfiram/Kupfer (Rauten) im Vergleich zu dreifachen Applikation aus Disulfiram/Kupfer und 1µM Auranofin (AUR) (Rechtecke).

Für die Immunblotanalyse wurden OVCAR-3 Zellen 24 Stunden entweder mit 1µM Auranofin, 250nM Disulfiram/Kupfer oder einer Kombination aller drei Medikamente behandelt. Eine ausgeprägte Erhöhung der HSP70 Expression durch die Dreifachkombination konnte nicht gezeigt werden, da HSP70 bereits bei einer Konzentration von 250nM Disulfiram/Kupfer massiv induziert wurde. Jedoch wurde die Dimerisation von HSP27 durch die Dreifachtherapie im Vergleich zur alleinigen Therapie mit Disulfiram/Kupfer verstärkt.

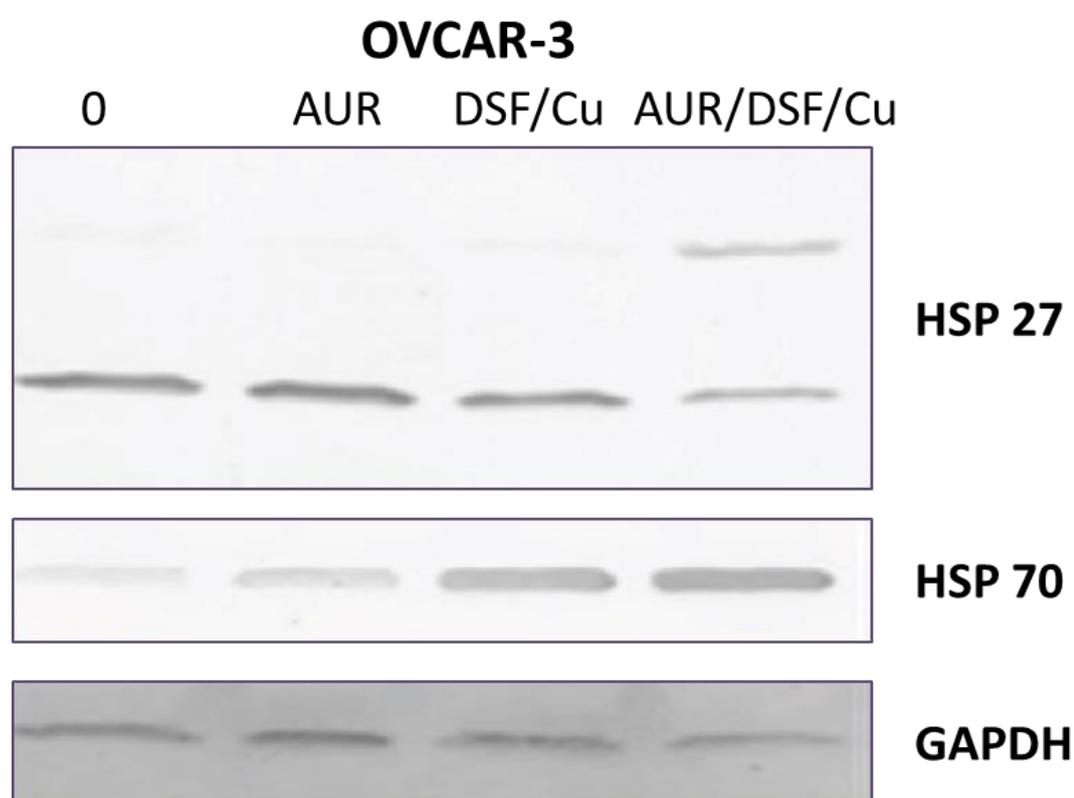


Abbildung 18: Darstellung der Hitzeschockreaktion im Western Blot: Zellen der Linie OVCAR-3 wurden für 24h mit 1µM Auranofin (AUR), 250nM Disulfiram/Kupfer (DSF/Cu) bzw. mit einer Kombination aller drei Medikamente behandelt. Die Zelllysate wurden dann im Western Blot analysiert.

3.4 Einfluss der Kombinationstherapien auf Mammakarzinomzellen

3.4.1 Einfluss von Disulfiram/Kupfer

Chen D. et al konnten zeigen, dass die Kombination aus Disulfiram und Kupfer das Wachstum in Zellen des Mammakarzinoms signifikant hemmt (Chen et al., 2006). Die Wirksamkeit von Disulfiram/Kupfer auf die Mammakarzinomzelllinie MCF-7 konnte in dieser Arbeit mit Hilfe eines MTT-Tests bestätigt werden. Es zeigte sich eine deutliche Reduktion des Zellwachstums in Abhängigkeit der applizierten Konzentration. Bereits ab 125nM äquimolarer Konzentration aus Disulfiram und Kupfer konnte ein reduziertes Zellwachstum verzeichnet werden. Nach Applikation von 375nM Disulfiram/Kupfer konnten kaum mehr überlebende Zellen gezählt werden. Im Gegensatz hierzu zeigte die Behandlung der Mammakarzinomzellen MB-231 mit Disulfiram/Kupfer bis zu einer Konzentration von 375nM fast keine Reduktion des Zellwachstums. Dies ist insofern bedeutsam, da es sich bei der MDA-MB-231 Zelllinie um eine sog. „triple-negative“ Mammakarzinomzelllinie handelt, die für eine äußerst schwer zu therapierbare Tumorart steht. Dies weist auch darauf hin, dass einige Mammakarzinomzellen im Gegensatz zu den fast ausschließlich gut auf Disulfiram/Kupfer reagierenden Ovarialkarzinomzellen schwieriger mit dieser Kombination zu therapieren wären bzw. deutlich höhere Konzentrationen bräuchten.

Um die Gründe dafür besser zu verstehen, wurden auch hier Western Blots und PCR Analysen vorgenommen. Für die Western Blot Analyse wurden Zellen der Linien MCF-7 und MDA-MB-231 in äquimolarer Konzentration aus Disulfiram/Kupfer 24 Stunden lang inkubiert. Dabei zeigte sich keine Induktion von HSP90 α und - β . HSP90 α wurde in den Zellen der Linie MDA-MB-231 unabhängig der Medikamentenapplikation gleichbleibend deutlich verstärkt exprimiert. MCF-7 Zellen zeigten ab einer Konzentration von 500nM Disulfiram/Kupfer, MDA-MB-231 Zellen bereits ab einer Konzentration von 250nM eine Induktion von HSP70. Um den Einfluss von Disulfiram/Kupfer auf transkriptioneller Ebene zu überprüfen, wurden MCF-7 Zellen für 4 Stunden mit diesen Substanzen behandelt. HSPA1 (HSP72, iHSP70) wurde bereits ab einer Konzentration von 500nM Disulfiram/Kupfer in den MCF-7 Zellen hochreguliert. CHOP, Marker des akuten ER-Stress (Schönthal, 2013), wurde nicht durch den Einfluss von bis zu 1 μ M Disulfiram/Kupfer in den Zelllinien des Mammakarzinoms induziert.

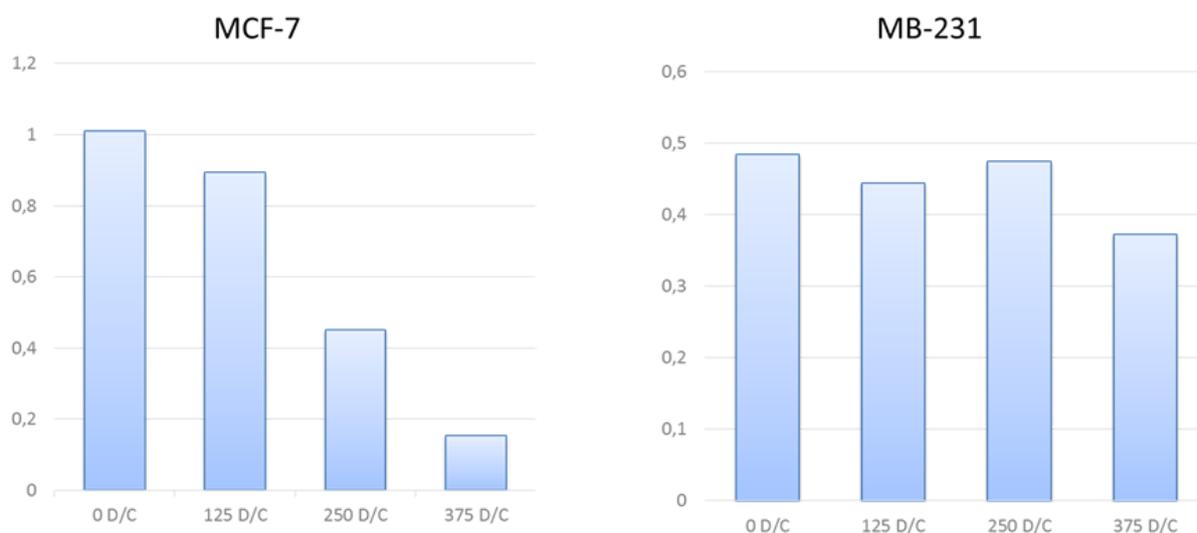


Abbildung 19: MTT-Test: Darstellung des Zellüberlebens und der Sensitivität der Mammakarzinomzelllinien MCF-7 und MDA-MB-231 gegenüber Disulfiram/Kupfer. Die Zellen wurden 72h lang mit Disulfiram/Kupfer (D/C) in ansteigender Konzentration von 0-375nM behandelt.

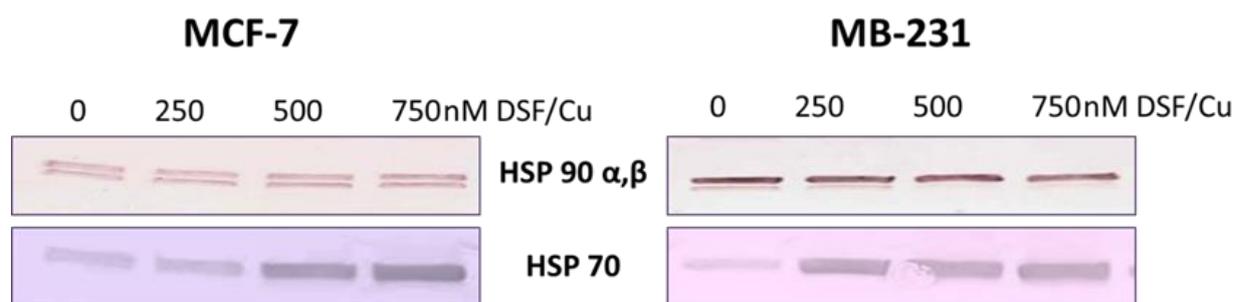


Abbildung 20: Western Blot: Zellen der Linie MCF-7 und MDA-MB-231 wurden 24h lang mit aufsteigender Konzentration Disulfiram/Kupfer (DSF/Cu) behandelt.

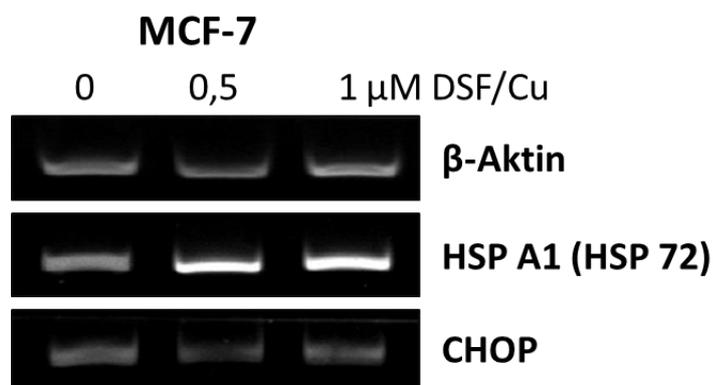


Abbildung 21: PCR: Zellen der Linie MCF-7 wurden 4h lang in 0,5 bzw. 1 μ M Disulfiram/Kupfer (DSF/Cu) inkubiert.

3.4.2 Einfluss von Auranofin

Auranofin als potenter Inhibitor der Thioredoxin-Reduktase und Induktor von reaktiven Sauerstoffspezies (engl. Reaktive oxygen species, ROS) wird als vielversprechende Therapieoption für viele Malignome wie Ovarialkarzinom und Brustkrebs gehandelt (Gandin et al., 2010; Marzano et al., 2007; Nobili et al., 2010; Madeira et al., 2012).

Der MTT-Test bestätigte eine konzentrationsabhängige Reduktion des Zellüberlebens bei MCF-7 und MB-231 Zellen durch Auranofin. Bereits eine Konzentration von 0,25 μ M Auranofin führte zu einer eindeutigen Verminderung der Zellviabilität.

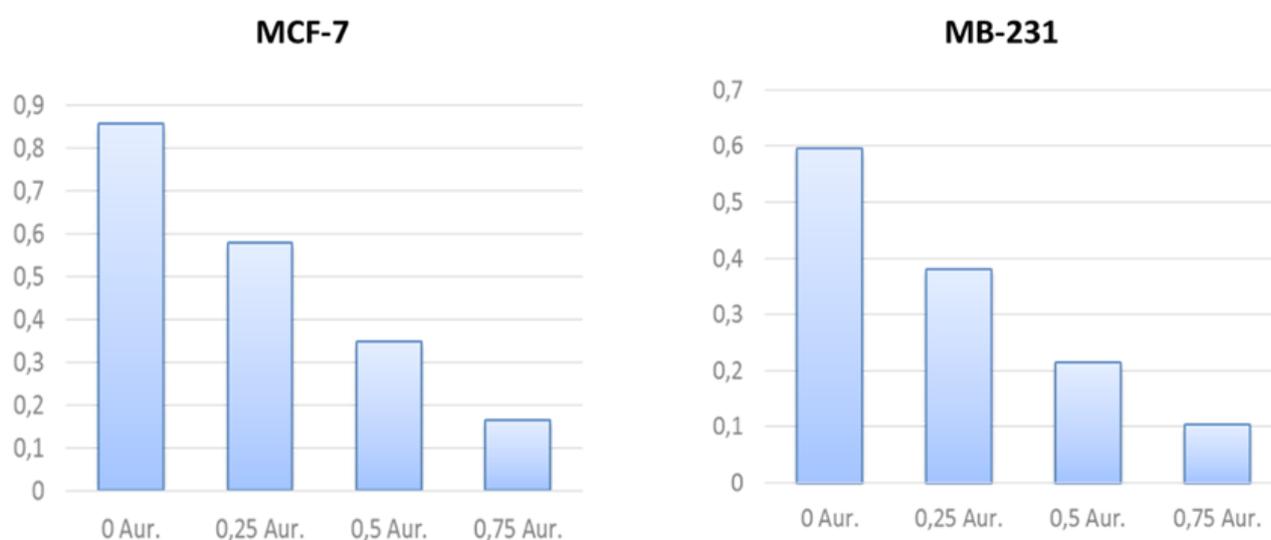


Abbildung 22: MTT-Test: Darstellung des Zellüberlebens und der Sensitivität der Mammakarzinomzelllinien MCF-7 und MB-231 gegenüber Auranofin. Die Zellen wurden 72h lang mit Auranofin in ansteigender Konzentration von 0,25-0,75 μ M Auranofin (Aur) behandelt.

Um diese Wirkung von Auranofin auf transkriptioneller Ebene nachvollziehen zu können, wurde eine PCR durchgeführt. Entsprechend den Ergebnissen der MTT-Assays, die bei MCF-7 Zellen bereits bei niedrigen Konzentrationen von Auranofin ein vermindertes Zellüberleben zeigten, wurden die Zellen 24 Stunden lang mit 0,25 μ M, 0,5 μ M und 0,75 μ M Auranofin behandelt. Auf transkriptioneller Ebene zeigte sich keine Regulation der Hitzeschockproteine. Lediglich eine vermehrte Expression der Hämoxxygenase (HMOX1) konnte ab einer Konzentration von 0,25 μ M Auranofin festgestellt werden. CHOP zeigte keine Regulation durch Auranofin.

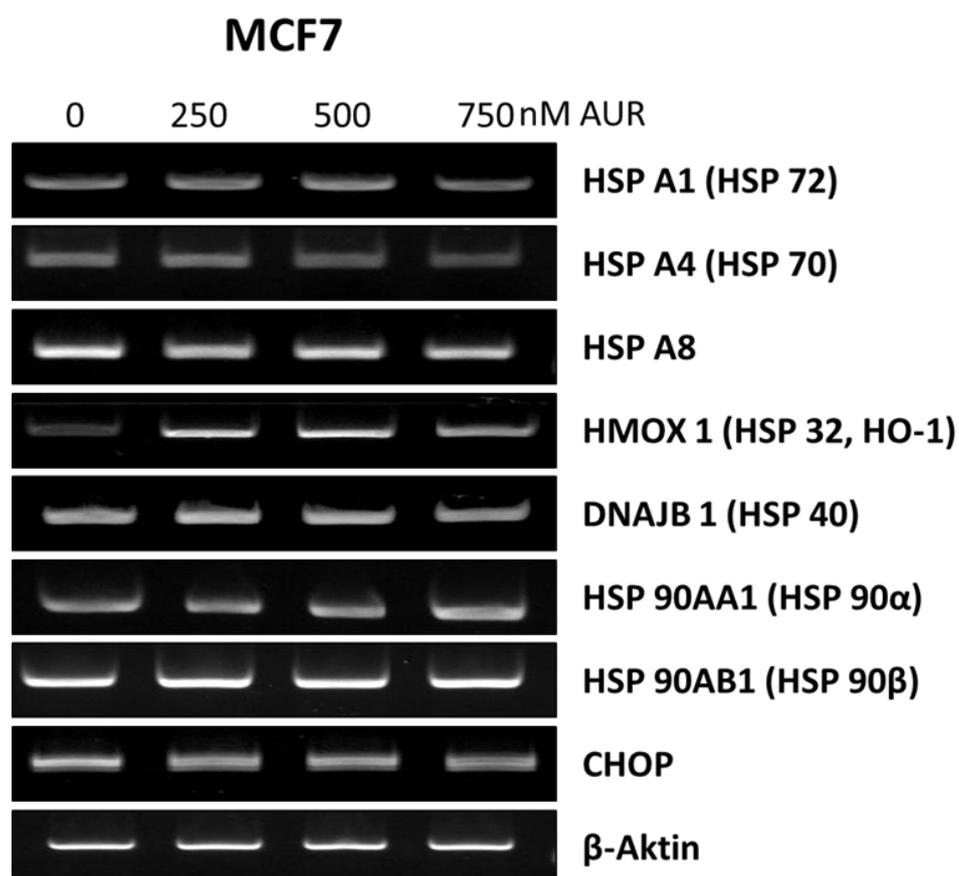


Abbildung 23: Darstellung der Hitzeschockreaktion in der PCR: Zellen der Linie MCF-7 wurden 24h lang mit aufsteigender Konzentration Auranofin (AUR) behandelt. Die Zelllysate wurden in der PCR analysiert.

4 Diskussion

4.1 Disulfiram

4.1.1 Wirkungsweise

In dieser Arbeit konnte die wachstumshemmende Wirkung von Disulfiram bzw. Disulfiram in Kombination mit Kupfer auf Ovarialkarzinomzellen gezeigt werden (siehe Abbildung 9). In den mit Disulfiram/Kupfer behandelten Zellen wurde eine PARP-Spaltung als Nachweis abgelaufener Apoptose festgestellt.

In der Literatur werden verschiedene Ursachen für die Wirksamkeit von Disulfiram und der Kombination Disulfiram/Kupfer auf Tumorzellen genannt. Ausführlich beschrieben ist die Hemmung des P-Glykoproteins (P-gp) durch Disulfiram. Disulfiram hemmt das P-gp (siehe Abbildung 24), reduziert deswegen möglicherweise die Resistenz gegenüber bestimmten Chemotherapeutika und erhöht die Sensitivität des Tumorgewebes gegenüber zytotoxischen Substanzen (Loo und Clarke, 2000). Das P-Glykoprotein bindet als ein Teil der Zellmembran ein großes Spektrum an zytotoxischen Substanzen und pumpt sie aus der Zelle (Ambudkar et al., 1999). Loo et al. konnten zeigen, dass Disulfiram bereits die Reifung des P-Glykoproteins verhindert. Mit Disulfiram behandelte Zellen weisen eine höhere Sensitivität gegenüber Vinblastin und Cholchicin auf (Loo und Clarke, 2000). Auch andere Autoren beschreiben, wie Disulfiram die Wirkung verschiedener klassischer Zytostatika sowie der Strahlentherapie verbessert (Hacker et al., 1982; Bodenner et al., 1986). So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass Disulfiram die zytotoxische Wirkung von Gemcitabin auf Brust- und Kolonkarzinomzellen verstärkt. Da Disulfiram die Blut/Hirnschranke überwinden kann, zeigt das Medikament außerdem Wirkung auf Glioblastomzellen (Guo et al., 2010; Liu et al., 2012). Neben der Hemmung des P-Glykoproteins scheint die Inhibierung der ALDH-Aktivität (siehe Abbildung 24) eine Rolle für die antineoplastische Wirkung von Disulfiram zu spielen. Nach vorangegangener Zytozytoreduktion durch verschiedene Chemotherapeutika kann der Tumor durch die ALDH-Aktivität der Stammzellen schnell wieder an Masse gewinnen. Wird jedoch die Aldehyddehydrogenase (ALDH) durch Disulfiram blockiert, kann die Stammzellfunktion der Tumorzellen beispielsweise in Glioblastomen gehemmt werden (Kast et al., 2013; Kast und Belda-Iniesta, 2009).

4.1.2 Disulfiram als Proteasom-Inhibitor

Als weitere Ursache für die antitumorale Wirkung von Disulfiram werden die proteasominhibitorischen Eigenschaften von Disulfiram beschrieben (Cvek und Dvorak, 2008; Cvek und Dvorak, 2007; Conticello et al., 2012) (siehe Abbildung 24). Das Proteasom ist essentiell für die Aufrechterhaltung der Zellhomöostase (Mitch und Goldberg, 1996), da die meisten intrazellulären Proteine durch das Ubiquitin-Proteasom-System abgebaut werden (Rock et al., 1994). Zum Abbau bestimmte Proteine werden durch das Anhängen von Ubiquitinketten markiert und dann durch das Proteasom zu Peptiden abgebaut (Glickman und Ciechanover, 2002; Pickart, 2004, Ciechanover und Stanhill, 2014). Proteasome verhindern so die Ansammlung nicht funktionsfähiger, beschädigter oder fehlgefalteter Proteine in der Zelle (Goldberg, 2003). Eine Proteasomhemmung durch Disulfiram wurde bereits für Prostata- und Brustkrebszellen beschrieben sowie für Zelllinien des malignen Melanoms (Chen et al., 2004; Chen et al., 2006). Die Hemmung des Proteasoms führt schließlich zur Akkumulation von polyubiquitinierten Proteinen in einer Zelle und zur Bildung zytotoxischer Proteinaggregate (Römisch, 2005; Chen und Dou, 2010, Frezza et al., 2011). Polyubiquitinierte Proteine, die nicht durch das Proteasomsystem abgebaut werden können, sind hochtoxisch für die Zelle und können alternativ durch Lysosomen und Autophagie abgebaut oder in paranukleären Aggresomen abgelagert werden (Johnston et al., 1998; Brüning und Jückstock, 2015). Derzeit werden verschiedene proteasominhibitorische Substanzen auf ihre klinische Anwendbarkeit getestet (Johnson, 2015; Kisselev et al., 2012; Kubiczkova et al., 2014; Allegra et al., 2014, Brüning und Jückstock, 2015). In dieser Arbeit konnte nach der Applikation von Disulfiram und Kupfer eine Aggregation polyubiquitiniertes Proteine in der Immunblotanalyse nachgewiesen werden (siehe Abbildung 11). Dies spricht für eine Inhibierung des Proteasoms durch die Kombinationstherapie Disulfiram/Kupfer auch in den untersuchten Ovarialkarzinomzellen.

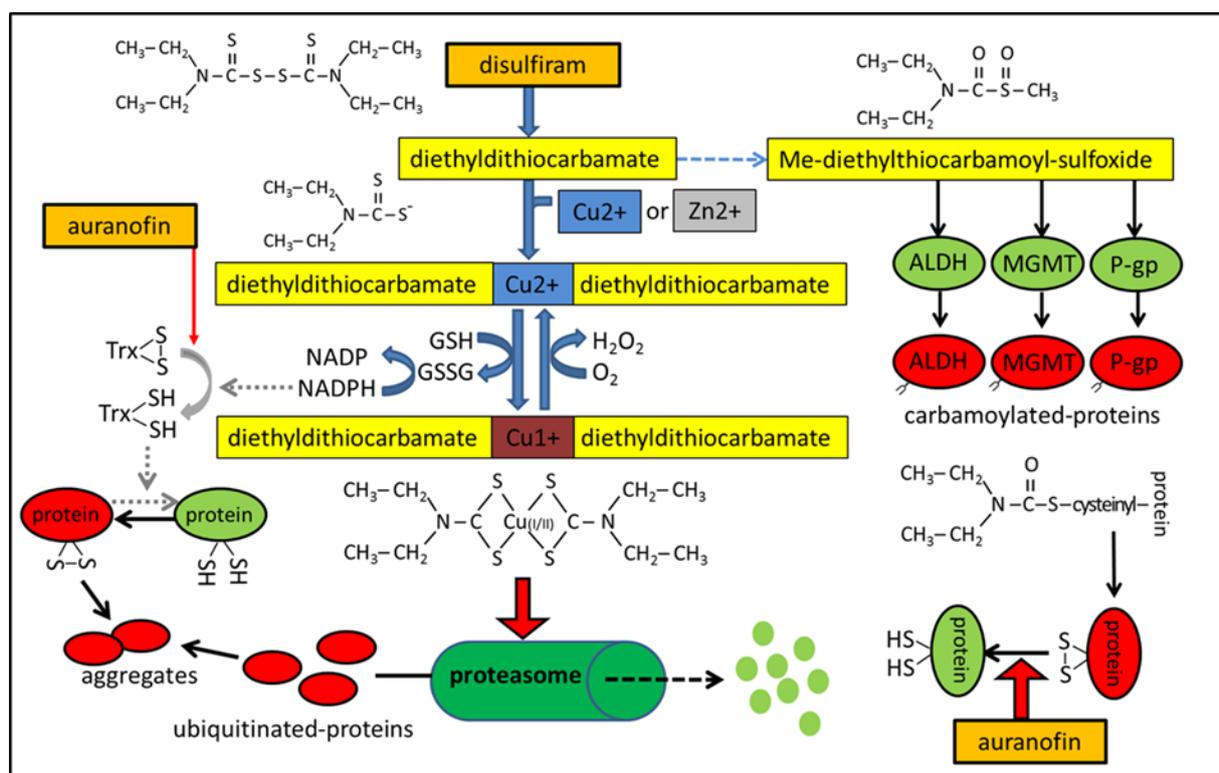


Abbildung 24: Schematische Darstellung des Disulfiramstoffwechsels: Nach oraler Aufnahme wird Disulfiram in 2 Moleküle Diethyldithiocarbamat gespalten. Diese werden dann methyliert und durch das Cytochrom P 450 zu Diethyldithiocarbamid-Methylester-Sulfoxid verstoffwechselt. Man geht davon aus, dass Disulfiram in dieser Form mit der Aldehyddehydrogenase (ALDH), dem P-Glykoprotein (P-gp), dem Glutamat Rezeptor und der Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) reagiert. Durch die Bindung von Kupfer- oder Zinkionen führt Diethyldithiocarbamid (EtDTC) zu einer intrazellulären Akkumulation dieser redoxaktiven Ionen und damit zu oxydativem Stress in der Zelle. In Kombination mit Kupferionen hemmt Disulfiram außerdem das Proteasom und verursacht so eine Akkumulation zytotoxischer Proteinaggregate. Die gleichzeitige Inhibition des Thioredoxinsystems (Trx) durch Auranofin oder der NADPH-Verbrauch führen zur weiteren Akkumulation fehlgefalteter Proteine und können so den zytotoxischen Effekt von Disulfiram verstärken (Brüning, Kast, 2014).

4.1.3 NF- κ B Inhibition durch Disulfiram

Durch den ubiquitinabhängigen Abbau nimmt das Proteasom auch Einfluss auf die Transkriptionsvorgänge in der Zelle, indem Transkriptionsfaktoren ubiquitiniert und dann durch das Proteasom abgebaut werden (Lipford et al., 2005). Die meisten Proteine, die durch das Ubiquitin-Proteasom-System reguliert werden, kontrollieren die intrazelluläre Homöostase beispielsweise durch Regulation des NF- κ B-Inhibitors I κ B (Brancolini, 2008; Jariel-Encontre et al., 2008). Der Transkriptionsfaktor NF- κ B spielt eine wichtige Rolle in der Regulation von Zellproliferation bzw. Apoptose (Dolcet et al., 2005). Er wirkt antiapoptotisch, indem er die Expression von Apoptose inhibierenden Faktoren fördert (Wang et al., 1998; Takahashi et al., 1998). Durch die Hemmung von NF- κ B wird die zytotoxische Wirkung antitumoraler Substanzen in vivo und in vitro verstärkt (Wang et al., 1996; Wang et al., 1999). Auch die antitumorale Aktivität von Disulfiram wird in verschiedenen Veröffentlichungen auf die Hemmung von NF- κ B zurückgeführt (Lövborg et al., 2006; Yip et al., 2011). So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass Disulfiram durch eine Inhibierung von NF- κ B die zytotoxische Aktivität von 5-Fluoruracil auf Kolonkarzinomzellen in der Zellkultur erhöht (Wang et al., 2003). In dieser Arbeit konnte keine Hemmung von NF- κ B in den Ovarialkarzinomzellen OVCAR-3 bzw. SKOV-3 festgestellt werden. Der NF- κ B Inhibitor I κ B (Karin und Ben-Neriah, 2000) wurde in den Zellen nicht durch Disulfiram/Kupfer akkumuliert. Auch in der zeitabhängigen Immunblotanalyse konnte keine Akkumulation von I κ B und damit eine Hemmung von NF- κ B durch Disulfiram/Kupfer gezeigt werden (siehe Abbildung 10C). Stattdessen ergab sich eine Reduktion von I κ B und somit eine mögliche Aktivierung von NF- κ B. Eine tatsächliche Aktivierung von NF- κ B beispielsweise über die Translokation der funktionellen p65 Untereinheit aus dem Zytosol in den Zellkern konnte jedoch nicht festgestellt werden. In der zellfraktionierten Immunblotanalyse zeigt sich p65/RelA, eine Untereinheit von NF- κ B (Karin und Ben-Neriah, 2000), in der zytosolischen Fraktion. Auch nach 3 bzw. 6-stündiger Behandlung mit Disulfiram/Kupfer fand keine Verschiebung von NF- κ B in die nukleäre Fraktion statt (siehe Abbildung 13). Dies würde eine Aktivierung von NF- κ B darstellen, da der Transkriptionsfaktor NF- κ B durch die Interaktion mit I κ B im Zytosol gehalten wird. Durch den Ubiquitin abhängigen Abbau von I κ B wird NF- κ B freigesetzt und kann in den Nukleus übergehen, um dann an die DNA zu binden (Karin und Ben-Neriah, 2000). Auch in der Immunfluoreszenzanalyse konnte keine

Regulation von p65 (Rel A) beobachtet werden. Es zeigte sich eine gleichbleibend starke Expression des Proteins im Zytosol der Zellen. Eine Verschiebung von p65 in den Nukleus nach der Behandlung mit Disulfiram/Kupfer und damit eine Aktivierung von NF- κ B fand nicht statt (siehe Abbildung 14A,B). Der proapoptotische Einfluss von Disulfiram/Kupfer auf die Ovarialkarzinomzellen scheint also unabhängig von einer Regulation des NF- κ B zu sein.

4.1.4 Hitzeschockinduktion durch Disulfiram/Kupfer

Bei Ausschaltung des Proteasomsystems werden die zellulären Hitzeschockproteine aktiviert, um die Bildung von Proteinaggregaten zu verhindern und den Proteinabbau zu unterstützen (Lanneau et al., 2010; Wang, 2011). Eigentlich ging man davon aus, dass Hitzeschockproteine und das Ubiquitin-Proteasom-System um den selektiven Abbau von beschädigten oder fehlgefalteten Proteinen konkurrieren. Jedoch scheint es vermehrt Hinweise zu geben, dass HSPs auch den Abbau von bestimmten Proteinen fördern (Garrido und Solary, 2003; Brüning und Jückstock, 2015). Möglicherweise verhindern Hitzeschockproteine eine Akkumulation von denaturierten Proteinen, indem sie den Ubiquitin abhängigen Abbau von Proteinen fördern (Friant et al., 2003). So konnten weitere Enzyme identifiziert werden mit der Fähigkeit, Ubiquitin an Proteine zu binden (Ubiquitin Ligase Aktivität) wie etwa CHIP, welches wiederum mit HSP70 interagiert (Hatakeyama und Nakayama, 2003). Aufgrund seiner doppelten Bindungskapazität verbindet CHIP die Chaperone mit dem Ubiquitin-Proteasom-System (Wickner et al., 1999) (siehe Abbildung 2).

In dieser Arbeit konnte eine ausgeprägte Hitzeschockreaktion durch Disulfiram und Kupfer gezeigt werden, mit Nachweis der Induktion von Hitzeschockgenen in der PCR (siehe Abbildung 12) und einer erhöhten Expression von Hitzeschockproteinen im Immunblot (siehe Abbildung 10).

4.1.5 Aktivierung des Hitzeschockfaktors 1

Im Western Blot konnte eine Aktivierung des HSF1 durch Hyperphosphorylierung sowie eine Translokation des Hitzeschockfaktors in die nukleäre Fraktion nach der Applikation von Disulfiram/Kupfer festgestellt werden. Gleichzeitig zeigte sich eine Phosphorylierung von HSP27 durch die Kombinationstherapie. Dies entspricht der Annahme, dass HSP27 in seiner nicht phosphorylierten Form als großes Oligomer die Aktivität des Transkriptionsfaktors HSF1 blockiert (Brunet Simioni et al., 2009) (siehe Abbildung 3). Wie einleitend bereits erwähnt kommt dem HSF1 eine grundlegende Bedeutung in der Regulation und Aktivierung der Hitzeschockproteine unter Stressbedingungen zu (Wu, 1995; Mormoto, 2008). Die Induktion der Hitzeschockreaktion ist essentiell für das Überleben der Zelle und spielt eine wichtige Rolle für die Anpassung an Umweltbedingungen. Entsprechend kann in vielen Krebsarten eine dauerhaft vermehrte Expression von Hitzeschockproteinen verzeichnet werden. Es wird angenommen, dass eine ständig erhöhte Expression von Hitzeschockproteinen die Zellproliferation fördert und proapoptotische Signale hemmt (Jolly und Morimoto, 2000). In der Tumorzelle verschiebt sich das Gleichgewicht zwischen Zellüberleben und Apoptose zu unkoordiniertem Zellüberleben und Zellproliferation. In diesem Prozess spielen antiapoptotische Faktoren wie Hitzeschockproteine, die der Zelle eine höhere Widerstandskraft gegen schädigende Umweltfaktoren verleihen, eine wichtige Rolle (Jaattela, 1999 a; Jaattela, 1999 b). Verschiedene Krebsarten zeigen beispielsweise eine erhöhte Expression von HSP27 bzw. HSP70 (Ciocca et al., 1993; Kaur und Ralhan et al., 1995; Ciocca et al., 1993). So konnte in der PCR in den untersuchten Ovarialkarzinomzellen bereits in den Kontrollzellen eine hohe Expression von HSP90 α und - β beobachtet werden (siehe Abbildung 12). Durch Regulation der Hitzeschockreaktion hat der HSF1 große Bedeutung für das Zellüberleben und die maligne Transformation der Zelle, da die Zelle vor der Apoptose geschützt wird. Es konnte gezeigt werden, dass eine Ausschaltung des HSF1 in verschiedenen Tumorzelllinien mit einem deutlich verminderten Zellüberleben und Zellwachstum einhergeht (Dai et al., 2007). Zusammenfassend lässt sich feststellen: Einerseits ist die akute Hitzeschockreaktion essentiell für das Überleben der Zelle in einer Stresssituation, wobei es zu einer Akkumulation toxischer Proteinaggregate und schließlich zum Zelltod kommt, wenn die Hitzeschockreaktion nicht ausreicht, um den

Zellschaden zu beheben. Andererseits scheinen chronisch erhöhte Hitzeschockfaktoren die Onkogenese zu fördern (Verghese et al., 2012).

4.1.5.1 Phosphorylierung von HSP27 durch Disulfiram/Kupfer

Nach der Behandlung der Ovarialkarzinomzellen mit Disulfiram und Kupfer konnte im Western Blot keine erhöhte Expression von HSP27 festgestellt werden (siehe Abbildung 10). Lanneau et al. gehen davon aus, dass das Chaperon im unphosphorylierten Zustand und in seiner großen oligomeren Form im Nukleus eingeschlossen ist. Somit hätte nicht-phosphoryliertes HSP27 Zugang zu nukleären Proteinen wie etwa zum Transkriptionsfaktor HSF1 (Lanneau et al., 2010) (siehe Abbildung 3). Das heißt, durch die Phosphorylierung wird nicht nur die Funktion des Hitzeschockproteins kontrolliert sondern auch seine subzelluläre Verteilung. Phosphoryliertes HSP27 liegt als kleines Dimer vor und kann sowohl im Nukleus als auch im Zytosol gefunden werden, da wahrscheinlich die kleine Größe einen einfachen Verkehr zwischen den Zellkompartimenten erlaubt. So könnte phosphoryliertes HSP27 den Abbau von zytosolischen und nukleären Proteinen induzieren (Lanneau et al., 2010). Allerdings wurde in dieser Arbeit in der zellfraktionierten Immunblotanalyse ein vermehrtes Vorkommen von nicht phosphoryliertem HSP27 in der zytosolischen Fraktion der unbehandelten Zellen festgestellt. Dies entspricht den Ergebnissen von Vos et al., die als subzelluläre Lokalisation von nicht phosphoryliertem HSP27 das Zytosol angeben (Vos et al., 2008). Da der HSF1 in dieser Arbeit sowohl im Zytosol als auch in der nukleären Fraktion der Kontrollzellen nachgewiesen werden konnte, ist eine Hemmung durch nicht-phosphoryliertes HSP27 in der zytosolischen Fraktion möglich. Erst nach der Behandlung mit Disulfiram und Kupfer konnte eine klare Verschiebung von HSP27 aus der zytosolischen in die nukleäre Fraktion beobachtet werden (siehe Abbildung 13). Gleichzeitig zeigte sich eine klare Induktion des phosphorylierten HSP27 durch Disulfiram/Kupfer (siehe Abbildung 10). So kann von einer Verschiebung von Phosphor-HSP27 in die nukleäre bzw. paranukleäre Fraktion ausgegangen werden.

4.1.5.2 Desintegration des Zytoskeletts durch Disulfiram/Kupfer

Neben seiner Rolle in der Hitzeschockreaktion ist HSP27 außerdem an der Erhaltung des Zytoskeletts beteiligt (Wettstein et al., 2012; Bryantsev et al., 2007). Man nimmt an, dass HSP27 mit Aktin interagiert und so die Zellstruktur vor schädlichen Umwelteinflüssen schützt (Vigilanza et al., 2008). Aktin kommt in fast allen eukaryotischen Zellen vor. Das Aktinfilament (F-Aktin) besteht aus Aktinmonomeren (G-Aktin). Monomeres G-Aktin polymerisiert zu einem helikalen, zweisträngigen Polymer (F-Aktin). Da G-Aktin ein asymmetrisches Protein ist, weist das polymere F-Aktin eine Polarität auf. Am Plus-Ende polymerisiert das Filament, am Minus-Ende zerfällt es in seine Monomere. Durch den dynamischen Auf- und Abbau der Mikrofilamente kann die Zelle ihre Form schnell ändern. (Rassow et al., 2008; Pollard und Borisy, 2003). Durch Bindung von denaturierten Aktinfilamenten verhindert HSP27 die Aggregation der Filamente und vereinfacht den anschließenden Wiederaufbau des Zytoskeletts (Pivovarova et al., 2005). Die Interaktion von HSP27 mit dem Aktinskelett scheint ebenfalls durch den Phosphorylierungsstatus des Hitzeschockproteins beeinflusst zu werden (Mounier, Arrigo, 2002). Nicht-phosphoryliertes HSP27 bindet das Plus-Ende der G-Aktinfilamente und inhibiert dadurch die Aktinpolymerisation. Die Bindung des Plus-Endes in der nicht gestressten Zelle fördert einen hohen Umsatz an Aktinfilamenten und ist damit Voraussetzung für die Zellmotilität (Doshi et al., 2010; Doshi et al., 2009). Durch Phosphorylierung von HSP27 ändert sich seine Rolle in der Regulation des Zytoskeletts. Anstatt das Plus-Ende des Aktinfilaments zu binden, assoziieren die durch Phosphorylierung entstandenen kleinen Untereinheiten des HSP27 mit den Seiten des F-Aktinfilaments nach Stressinduktion, um das Aktinfilament zu stabilisieren (Doshi et al., 2010; Rogalla et al., 1999). Das heißt, in seiner nicht phosphorylierten Form hemmt HSP27 die Aktinpolymerisation während die phosphorylierte Form eine vermehrte Polymerisation zulässt (Doshi et al., 2009; During et al., 2007). Clare und Mearow konnten zeigen, dass es durch zellulären Stress zu einer erhöhten Assoziation von phosphoryliertem HSP27 und Aktin kommt. Nach dem Hitzeschock wurde eine insgesamt gesteigerte Expression von Phosphor-HSP27 und eine Ko-Lokalisation mit Aktin bei gleichzeitiger Desintegration des Zytoskeletts festgestellt. In den Kontrollzellen zeigte sich unphosphoryliertes HSP27 ebenfalls in Assoziation mit Aktin jedoch gleichmäßig im Zytoplasma verteilt. Clarke und Mearow trennten nach Auslösung eines Hitzeschocks die Zytosol- von der

Zytoskelettfraktion und konnten im Western Blot einen erhöhten Anteil an HSP27 in der Zytoskelettfraktion beobachten (Clarke und Mearow, 2013). So darf die Erkenntnis von Clarke und Mearow, dass die Phosphorylierung von HSP27 und die darauffolgende Veränderung des Zytoskeletts in Zusammenhang stehen, auf die Ovarialkarzinomzellen übertragen werden, da sowohl eine ausgeprägte Phosphorylierung von HSP27 durch Disulfiram/Kupfer als auch eine Desintegration des Zytoskeletts gezeigt werden konnte (siehe Abbildung 15). Dies könnte die nach der Behandlung mit Disulfiram/Kupfer beobachtete schnelle Abrundung der Zellen und Loslösung vom Untergrund erklären. Außerdem wurden in der Immunfluoreszenzanalyse in den mit Disulfiram/Kupfer behandelten Zellen der Linie OVCAR-3 unter Verwendung eines HSP27 Antikörpers hochkonzentrierte paranukleäre Aggregate beobachtet. Die durch Hitzeschock ausgelöste Translokation von HSP27 aus dem Zytosol in die paranukleäre Region wurde bereits von anderen Autoren beschrieben (Borrelli et al., 2002). Die Funktion dieser paranukleären Aggregate ist bisher nicht bekannt; sie sind wahrscheinlich nicht an der Aufrechterhaltung des Zytoskeletts beteiligt (Doshi et al., 2009). Es ist jedoch davon auszugehen, dass es sich um sogenannte paranukleäre Aggresomen handelt, die aus Aggregaten missgefalteter Proteine bestehen. Ob HSP27 dort passiv als fehlgefaltetes Protein vorliegt oder aktiv als an der Wiederauflösung dieser Aggregate beteiligtes Chaperon, bleibt weiteren Studien vorbehalten.

4.1.6 Induktion von ER-Stress durch Disulfiram/Kupfer

4.1.6.1 Aktivierung der JNK durch Disulfiram/Kupfer

In der Immunblotanalyse wurde eine Induktion der proapoptotisch wirkenden JNK durch Disulfiram/Kupfer sowie eine Herunterregulation des antiapoptotisch wirkenden Faktors mcl1 festgestellt (siehe Abbildung 10A). Die Hemmung der antiapoptotischen Wirkung von mcl1 erfolgt über eine Phosphorylierung durch die JNK, wobei die Inaktivierung von mcl1 durch die JNK einen weiteren Signalweg darstellt, über den die Apoptose als Reaktion auf zellulären Stress induziert werden kann (Inoshita et al., 2002). Neben seiner proapoptotischen Funktion kann eine Aktivierung der JNK

auch mit einer Regulation von Zellproliferation und -überleben und damit einer antiapoptotischen Funktion assoziiert sein (Davies und Tournier, 2012; Krestnikova et al., 2015). So konnte in der Studie von Granato et al. gezeigt werden, dass Inhibitoren der JNK den antiproliferativen Effekt des Proteasominhibitors Bortezomib verbessern (Granato et al., 2013).

4.1.6.2 Apoptoseeinleitung durch Induktion von CHOP

Neben der Induktion der Hitzeschockproteine, einer Aktivierung der JNK und einer Herunterregulation des antiapoptotisch wirkenden Proteins mcl1 konnte über die Aktivierung von BIP und CHOP die Induktion von ER-Stress durch Disulfiram/Kupfer gezeigt werden. CHOP und BIP sind Marker, die zwischen chronischem und akutem ER-Stress unterscheiden. CHOP wird kurzfristig bei akut starkem ER-Stress vermehrt exprimiert, während es bei chronischem ER-Stress zu einer Hochregulation des Chaperons BIP kommt (Schönthal, 2013). In Reaktion auf ER-Stress aktiviert die Zelle Abwehrmechanismen, um die Homöostase der Zelle wiederherzustellen. Dauerhaft erhöhte Expression von BIP gehört zu den wichtigsten Überlebensstrategien der Tumorzelle (Hsu und Sabatini, 2008; Kroemer und Pouyssegur, 2008) und wurde bereits in vielen Tumorzelllinien dokumentiert (Pyrko et al., 2007; Lee, 2007). Wenn der ER-Stress nicht durch Aktivierung von BIP und anderen Faktoren bezwungen werden kann und eine große Menge an ungefalteten Proteinen über einen längeren Zeitraum besteht, wird unter anderem der proapoptotische Transkriptionsfaktor CHOP aktiviert (Nishitoh, 2012, Rutkowski et al., 2006). Nach Schönthal bilden die Faktoren BIP und CHOP die opponierenden Schlüsselfaktoren im ER-Stress. Verschiebt sich die Balance zu CHOP, wird der Zelltod eingeleitet. Vermehrte Expression von BIP fördert das Überleben der Zelle, was im Falle einer Tumorzelle verminderte Chemosensitivität bedeutet (Schönthal, 2012). Die vermehrte Expression von CHOP in den Ovarialkarzinomzellen bereits nach 3-stündiger Inkubation mit Disulfiram/Kupfer darf also als Hinweis auf eine frühe Induktion von akutem ER-Stress gesehen werden und zeigt die Induktion der Apoptose an (Ma et al., 2002). In dieser Arbeit wurde bereits in den Kontrollzellen eine massiv erhöhte Expression von BIP (HSPA5, GRP78) in den Zelllinien OVCAR-

3 und SKOV-3 in der PCR festgestellt. Dies kann ein weiteres Zeichen für eine maligne Transformation und erhöhte Chemoresistenz der untersuchten Zellen sein.

4.1.7 Erhöhte Wirksamkeit von Disulfiram in der Kombination mit Kupfer

Bei den beschriebenen Wirkungsmechanismen von Disulfiram kommt der Kombination mit Kupfer eine wichtige Rolle zu. Durch die alleinige Applikation von Disulfiram bzw. Kupfer konnte weder eine PARP-Spaltung noch eine Induktion von HSF1 oder phosphoryliertem HSP27 gezeigt werden (siehe Kapitel 3.2). Schon Chen et al zeigten, dass der Disulfiram/Kupfer-Komplex die Proliferation von Brustkrebszellen stärker hemmt als die Behandlung mit Disulfiram allein (Chen et al., 2006). Außerdem wurde beschrieben, dass die Kombination aus Kupfer und Disulfiram die Sensibilität von Brust- und Kolonkarzinomzellen sowie Leukämiezellen gegenüber herkömmlichen Chemotherapeutika weitaus mehr verstärkt als die alleinige Applikation von Disulfiram (Xu et al., 2011; Guo et al., 2010).

Wie einleitend bereits dargestellt wird Disulfiram in vivo nach der Aufnahme zu Diethyldithiocarbamid (EtDTC) reduziert (Johansson, 1992) und bildet einen Chelatkomplex mit Kupferionen (Hogarth, 2005) (siehe Abbildung 24). Durch die lipophilen Eigenschaften von Disulfiram und Kupfer/Disulfiram-Komplex (EtDTC)₂ kann die Verbindung durch die Zellmembran diffundieren und sich im Gewebe verteilen (Nelson et al., 2010). Chen et al. gehen davon aus, dass Disulfiram die Kupferionen in die Zelle transportiert und durch die Bindung verhindert wird, dass Kupfer mit unspezifischen Proteinen reagiert (Chen et al., 2006).

In dieser Arbeit wurde bereits in den durchgeführten MTT-Assays bei verschiedenen Ovarialkarzinomzellen eine deutlich erhöhte Wirksamkeit von Disulfiram in Kombination mit Kupfer beobachtet mit Ausnahme der Zellreihe OVMZ-37, die auch bei alleiniger Applikation von Disulfiram ab 1µM kaum Zellüberleben im Vergleich zur Kontrolle zeigte (siehe Abbildung 9). Es ist davon auszugehen, dass diese Zellen bereits Kupfer aus dem Zellkulturmedium akkumuliert haben und Disulfiram daher auch ohne weitere Zugabe von Kupfer als Disulfiram/Kupfer-Komplex wirken kann. Bei den übrigen getesteten Ovarialkarzinomzellreihen war die Zugabe von Kupfer notwendig, um eine maßgebliche Reduktion des Zellüberlebens zu erreichen. Die

Erkenntnis, dass maligne entartetes Gewebe in vivo höhere Konzentrationen an Kupfer als gesundes Gewebe akkumuliert (Huang et al., 1999; Nayak et al., 2003; Kuo et al., 2002), könnte bei der Therapie von Ovarialkarzinomen mit Disulfiram genutzt werden. Bei Nachweis erhöhter Kupferkonzentration in Krebszellen wie möglicherweise bei der Linie OVMZ-37 scheint eine alleinige Applikation von Disulfiram zu genügen, um das Zellwachstum zu reduzieren. Eine im Vergleich zum gesunden erhöhte Kupferkonzentration im malignen Gewebe ermöglicht eine tumorselektive Therapie von Patienten. Erhöhte Kupferkonzentrationen wurden bereits für Hirntumore (Turecky et al., 1984), Brustkrebs (Kuo et al., 2002; Rizk und Sky-Peck, 1984) Kolon- (Nayak et al., 2003) und Prostatakarzinom beschrieben (Habib et al., 1980). Neben der zytotoxischen Eigenschaft von Kupfer in Verbindung mit Disulfiram wurde bereits 1980 gezeigt, dass Kupfer eine kritische Rolle bei der Angiogenese spielt (McAuslan und Reilly, 1980). Es konnte gezeigt werden, dass Kupfer die Expression von VEGF (Vascular endothelial growth factor) induzieren kann (Frangoulis et al., 2007; Sen et al., 2002). Tumorwachstum und Metastasenbildung sind abhängig von der Angiogenese und Kupfer spielt eine wichtige Rolle in diesem Prozess (Huang und Carbone, 2015). Führt man sich die grundlegende Bedeutung der Angiogenese und Kupfer als Kofaktor der Gefäßneubildung für Tumorentwicklung vor Augen, ist an eine mögliche antiangiogenetische Therapie mit Kupferchelatoren zu denken (Pan et al., 2002; Antoniades et al., 2013). Das Kupfer bindende Potential des Kupferchelators Disulfiram bietet einen weiteren Ausblick auf einen möglichen selektiven Therapieansatz durch Disulfiram in vivo.

4.2 Verstärkung der zytotoxischen Wirkung von Disulfiram/Kupfer durch Auranofin

Wie einleitend bereits beschrieben, ist das Thioredoxinsystem ein weiterer Schutzmechanismus der Zelle, um Zellschädigungen durch reaktive Sauerstoffspezies zu verhindern. Es kann deswegen die Sensitivität der Zelle gegenüber zytotoxischen Substanzen vermindern (Biaglow und Miller, 2005). Eine erhöhte Expression von Thioredoxin wurde in vielen Malignomen festgestellt und geht mit aggressivem Wachstum und schlechter Prognose einher (Welsh et al., 2002; Raffel et al., 2003). Daher könnte die Blockade von Thioredoxin die Sensitivität der Zellen gegenüber einer Zytostatikatherapie verbessern oder die Entwicklung von Resistenzen verhindern (Powis und Montfort, 2001; Raininga et al., 2014). Die zytotoxische Wirkung von Auranofin auf Ovarialkarzinomzellen konnte schon von anderen Autoren nachgewiesen werden (Guidi et al., 2012). In dieser Arbeit wurde eine Verstärkung des zytotoxischen Effekts von Disulfiram/Kupfer durch Auranofin gezeigt (siehe Kapitel 3.3). Durch eine Blockade des Thioredoxinsystems erhöht Auranofin den antitumoralen Effekt von Disulfiram, das über die Induktion von oxidativem Stress wirkt (Kast et al., 2013).

4.3 Wirkung der Kombinationstherapien auf Mammakarzinomzellen

4.3.1 Disulfiram/Kupfer

Die bereits von anderen Autoren beschriebene Wirksamkeit von Disulfiram/Kupfer auf Mammakarzinomzelllinien (Chen et al., 2006; Wiggins et al., 2014) konnte für die Zellreihe MCF-7 im MTT-Test bestätigt werden. Bei der Mammakarzinomzelllinie MB-231 zeigte sich dagegen bis zu einer Konzentration von 375nM kaum eine Reduktion des Zellüberlebens durch Disulfiram/Kupfer (siehe Abbildung 19). Dies ist bedauerlich, da es sich bei der MDA-MB-231 Zelllinie um eine sogenannte „triple-negative“ Mammakarzinomzelllinie handelt, einem Mammakarzinomtypus mit besonders schlechter Prognose und Therapieoptionen, für die gerade auch solche Medikamentenrepositionierungen als zusätzliche Therapieoption gedacht waren.

Trotz der feststellbaren Reduktion des Zellüberlebens in den MCF-7 Zellen bereits ab sehr niedrigen Konzentrationen von 125nM Disulfiram/Kupfer erfolgte eine Induktion des Hitzeschockproteins HSPA1 auf transkriptioneller Ebene erst ab einer Konzentration von 500nM (siehe Abbildung 21). Der bereits bei niedriger Konzentration einsetzende Zelltod weicht von der erst bei höheren Konzentrationen einsetzender Hitzeschockreaktion ab. Auffallend ist besonders die späte Phosphorylierung von HSP27, da die unmittelbare Reaktion der Zelle auf proteotoxischen Stress durch die kleinen Hitzeschockproteine wie HSP27 ausgeführt wird (Shashidharamurthy et al., 2005; Ito et al., 2001).

Auch konnte keine Induktion des proapoptotischen Markers CHOP durch Disulfiram/Kupfer bis zu einer Konzentration von 1µM gezeigt werden. Chen et al. konnten eine Apoptoseinduktion durch die Kombinationstherapie aus Disulfiram/Kupfer für die Mammakarzinomzelllinien MB-231 und MCF-10 zeigen und eine PARP-Spaltung in den MB-231 Zellen ab einer Konzentration von 20µmol/L Disulfiram/Kupfer feststellen (Chen et al., 2006). Somit kann man davon ausgehen, dass die Apoptose induzierende Wirkung von Disulfiram bei den Zellen der MB-231 Linie erst ab einer deutlich höheren Konzentration eintritt als bei den in dieser Arbeit untersuchten Ovariakarzinomzellen.

4.3.2 Auranofin

Auranofin als potenter Inhibitor der Thioredoxin-Reduktase und Induktor von reaktiven Sauerstoffspezies (engl. Reaktive oxygen species, ROS) wurde bereits von verschiedenen Autoren als vielversprechende Therapiemöglichkeit für Brustkrebs gehandelt (Gandin et al., 2010; Nobili et al., 2010; Madeira et al., 2012). So konnten Kim et al zeigen, dass Auranofin das Wachstum von Mammakarzinomzellen der Linie MB-231 konzentrationsabhängig inhibiert. Dieser Effekt konnte dann durch N-Acetyl-Cystein (NAC), einem Fänger von ROS, inhibiert werden. Dies weist darauf hin, dass Auranofin über eine Induktion von ROS wirkt (Kim et al., 2013). Ein durchgeführter MTT-Assay zeigte eine Reduktion des Zellüberlebens schon ab einer Konzentration von 25µM Auranofin und bestätigte die hohe Wirksamkeit der Substanz auf Mammakarzinomzellen. Eine ähnlich hohe Wirksamkeit von Auranofin konnte bei der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 beobachtet werden (siehe Abbildung 22) und lässt sich möglicherweise dadurch erklären, dass die Brustkrebszellen der Linie MCF-7 die Thioredoxinreduktase überexprimieren und von dieser Überexpression abhängig zu sein scheinen (Liu et al., 2013).

4.4 Medikamentenrepositionierung

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eine hohe Wirksamkeit von Disulfiram in Kombination mit Kupfer auf Ovarialkarzinomzellen *in vitro* und legen deswegen nahe, Disulfiram für die Krebstherapie einzusetzen. Es konnte die Induktion von Hitzeschockproteinen und ER-Stress sowie die Desintegration des Zytoskeletts und schließlich die Apoptoseeinleitung durch Disulfiram/Kupfer gezeigt werden. Durch die gleichzeitige Inhibierung des Thioredoxinsystems durch Auranofin wurde der zytotoxische Effekt von Disulfiram/Kupfer verstärkt. Aufgrund seiner antitumoralen Wirkung bei geringem Nebenwirkungspotential eignet sich Disulfiram deshalb gut für die Medikamentenrepositionierung (Kast et al., 2013). Selbstverständlich kann die Repositionierung von Medikamenten die innovative Forschung und die Entwicklung neuer Substanzen nicht ersetzen. In dieser Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, wie das ursprünglich zur Therapie der Alkoholabhängigkeit eingesetzte Disulfiram einen Beitrag zur Krebstherapie leisten könnte. Das komplexe System der Zellentartung sollte durch möglichst multiple Ansätze beeinflusst werden, da eine Therapie, die an verschiedenen Zielstrukturen und Signalwegen der Tumorzelle ansetzt, effektiver ist als eine Therapie, die nur an eine spezifische Struktur mit hoher Affinität bindet (Agoston et al., 2005). Man geht davon aus, dass beim Ovarialkarzinom mindestens 5–10 molekulare Veränderungen für die maligne Transformation einer Ovarialepithelzelle zur Karzinomzelle notwendig sind. Diese können Onkogene aktivieren oder Tumorsuppressorgene inaktivieren. Das Ovarialkarzinom ist eine polygene Erkrankung, wobei die Veränderungen jeweils komplexe Stoffwechselnetzwerke beeinflussen. Daher können Patientinnen von einem besseren Verständnis der molekularen Grundlagen profitieren (Kreienberg et al., 2009). Anstatt einzelne Genprodukte zu binden, sollte die Krebstherapie verschiedene Zellstrukturen wie Proteasome oder Hitzeschockproteine beeinflussen (Shoshan et al., 2008), die als Indikator für Proteotoxizität dienen.

4.5 Ausblick

Möglicherweise könnte die Therapie mit Disulfiram in Kombination mit Auranofin einen Beitrag zur Behandlung des oft schwer therapierbaren Ovarialkarzinoms leisten. Obwohl Lewis et al. davon ausgehen, dass die mehrfach in vitro dokumentierte antitumorale Eigenschaft von Disulfiram in Kombination von Kupfer nicht in vivo übertragen werden kann (Lewis, 2014), wären weiterführende Studien zum klinischen Nutzen des Wirkstoffs durchaus sinnvoll. Derzeit wird Disulfiram als Krebsmedikament in verschiedenen klinischen Studien erprobt (Shim und Liu, 2014). So wird der Einfluss einer Kombinationstherapie aus Disulfiram und Kupfergluconat im Rahmen einer Phase I Studie auf therapieresistente solide Tumore mit Lebermetastasenbildung überprüft (Clinical Trials. Gov, 2014a). In Phase II wird Disulfiram/Kupfer zur Behandlung von Patienten mit erstdiagnostiziertem Glioblastom getestet. Hier soll die Therapie mit Disulfiram nach operativer Tumorresektion und vor Durchführung der üblichen Radiochemotherapie erfolgen. Die Autoren erwarten eine Reduktion der Rezidivrate durch die adjuvante Anwendung von Disulfiram (Clinical Trials. Gov, 2014b). Außerdem wurde Disulfiram in Kombination mit Zink in Phase II zur Therapie des malignen Melanoms klinisch getestet. Dabei soll das Überleben der Patienten sowie die Toxizität von Disulfiram evaluiert werden (Clinical Trials. Gov, 2014c). Die entsprechenden Ergebnisse sind zu diesem Zeitpunkt noch nicht veröffentlicht. Durch eine zusätzliche Therapie von Ovarialkarzinompatientinnen mit Disulfiram/Kupfer oder Auranofin könnte eine erhöhte Sensitivierung für die gängigen Therapieschemata erreicht werden. Die Therapie des Ovarialkarzinoms mit Cisplatin oder Carboplatin ist zwar hoch effektiv (Galluzi et al., 2012), der therapeutische Nutzen der platinhaltigen Chemotherapeutika wird jedoch durch Nebenwirkungen wie Nephrotoxizität (Kelland, 2000), Resistenzbildung und Auftreten sekundärer Malignome durch die Chemotherapie limitiert (Chen et al., 2009). Als Reaktion auf die Stressinduktion durch Cisplatin induziert die Zelle unter anderem die JNK (Siddik, 2003). So könnte eine gleichzeitige Therapie mit Disulfiram/Kupfer eine synergistische Wirkung mit platinhaltigen Chemotherapeutika haben, da in dieser Arbeit ebenfalls eine Wirksamkeit von Disulfiram/Kupfer auf die JNK gezeigt werden konnte (siehe Abbildung 10A). O'Brien et al. beschrieben eine Verstärkung des zytotoxischen Effekts von Cisplatin durch Disulfiram auf die Mammakarzinomzellen MCF-7, Ovarialkarzinomzellen SKOV-3 und Prostatakarzinomzellen PC3 (O'Brien et

al., 2012). Liu et al. konnten verminderte Resistenzen gegen das ebenfalls zur Ovarialkarzinombehandlung angewandte Paclitaxel bei gleichzeitiger Anwendung von Disulfiram in Mammakarzinomzellen der Linie MB-231 beobachten (Liu et al., 2013). Man geht davon aus, dass eine erhöhte Aktivität der Aldehyddehydrogenase für Chemoresistenzen in malignen Zellen verantwortlich ist und durch eine Inhibierung der Aldehyddehydrogenase wie etwa durch Disulfiram revidiert werden kann (Landen et al., 2010; Schafer et al., 2012). Zur Evaluation der Wirksamkeit und sicheren Anwendbarkeit von Disulfiram als Teil einer Kombinationstherapie wurde bereits eine multizentrische und randomisierte Doppelblindstudie in Phase II zur Behandlung des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms durchgeführt. Es nahmen 40 Patienten mit der Erstdiagnose eines nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms an der Studie teil. Eine operative Therapie oder Chemoradiatio hatte nicht stattgefunden. Die Patienten wurden mit Cisplatin und Vinorelbin behandelt, wobei die Hälfte der Patienten zusätzlich dreimal täglich 40mg Disulfiram erhielt. Die Einnahme von Disulfiram in dieser Dosierung wurde gut vertragen und es konnte eine verlängerte Überlebensdauer in der Experimentalgruppe verzeichnet werden (Nechushtan et al., 2015). Aufgrund der sicheren klinischen Anwendbarkeit eignet sich Disulfiram also sehr gut für eine Medikamentenrepositionierung in der Krebstherapie. Insbesondere bei der Kombinationstherapie von Ovarial- und Mammakarzinom sollten daher unbedingt weitere klinische Studien durchgeführt werden, um mögliche synergistische Wirkungsmechanismen mehrerer Medikamente zu nutzen und durch die gezielte Beeinflussung verschiedener Signalwege der Zelle eine Dosisreduktion von Chemotherapeutika und somit eine möglichst nebenwirkungsarme und zielgerichtete Behandlung für die Patienten zu erreichen. Falls der lebensverlängernde Effekt von Disulfiram in der Behandlung von Malignomen in weiteren klinischen Studien gezeigt wird, könnte Disulfiram als Teil des chemotherapeutischen Regimes eingesetzt und aufgrund der günstigen Finanzierung insbesondere auch in Gesundheitssystemen mit geringen Ressourcen etabliert werden (Nechushtan et al., 2015).

5 Zusammenfassung

Trotz vergleichsweise niedriger Fallzahlen des Ovarialkarzinoms werden in Deutschland jährlich etwa 9600 Neuerkrankungen mit 5500 Todesfällen pro Jahr registriert. Leider ist die Therapie des Ovarialkarzinoms bisher unbefriedigend. In dieser Arbeit wurde die antitumorale Wirkung des ursprünglich zur Therapie der Alkoholabhängigkeit eingesetzten Disulfirams auf verschiedene Ovarialkarzinomzelllinien evaluiert. Mit Hilfe von MTT-Tests, Immunblotanalysen, PCR und Immunfluoreszenzmikroskopie wurde der Einfluss dieser Substanz auf zellmorphologischer und molekularbiologischer Ebene untersucht. In Kombination mit Kupfer führte die Behandlung mit Disulfiram zu einer ausgeprägten Hitzeschockreaktion in den Zellen und zu einer Desintegration des Zytoskeletts. Es konnte eine Induktion von HSF1, HSP70, HSP40 und HSP32 sowie eine Phosphorylierung und Dimerisation von HSP27 und dessen Ablagerung in paranukleären Aggregaten gezeigt werden. Außerdem führte die Therapie mit Disulfiram/Kupfer zu einer Aktivierung der JNK und einer Hemmung des antiapoptotisch wirkenden Faktors mcl1 sowie zu einer ER-Stress assoziierten CHOP Aktivierung. Der Nachweis polyubiquitiniertes Proteins und die Stressinduktion in Zytosol und ER zeigen eine Aggregation zytotoxischer Proteine in verschiedenen subzellulären Kompartimenten, die zum Zelltod führen. Die zytotoxische Wirkung von Disulfiram/Kupfer auf die Ovarialkarzinomzellen wurde durch gleichzeitige Inhibierung des Thioredoxinsystems mit Auranofin verstärkt. Aufgrund seines geringen Nebenwirkungspotentials eignet sich Disulfiram für eine Medikamentenrepositionierung im Bereich der Krebstherapie und könnte aufgrund der günstigen Finanzierung auch in Gesundheitssystemen mit geringen Ressourcen etabliert werden. Der antitumorale Effekt sowie die synergistische Wirkungsweise von Disulfiram mit bereits etablierten Zytostatika sollte in weiteren klinischen Studien geprüft werden, um durch die gezielte Beeinflussung verschiedener Signalwege der Zelle eine Dosisreduktion von Chemotherapeutika und somit eine möglichst nebenwirkungsarme und zielgerichtete Behandlung für die Patienten zu erreichen.

6 Literaturverzeichnis

Agoston V, Csermely P, Pongor S: Multiple, weak hits confuse complex systems: A transcriptional regulatory network as an example. *Phys. Rev. E Stat Nonlin. Soft Matter Phys* 2005; 71:051909)

Allegra A, Alonci A, Gerace D, Russo S, Innao V, Calabrò L, Musolino C: New orally active proteasome inhibitors in multiple myeloma. *Leuk Res.* 2014; 38(1):1–9

Almasieh M, MacIntyre JN, Pouliot M, Casanova C, Vaucher E, Kelly ME, Di Polo A: Acetylcholinesterase inhibition promotes retinal vasoprotection and increases ocular blood flow in experimental glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2013; 54(5):3171-83

Ambudkar SV, Dey S, Hrycyna CA, Ramachandra M, Pastan I, Gottesman MM: Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Annu Rev PharmacolToxicol* 1999; 39:361–98

Anckar J, Sistonen L: Heat shock factor 1 as a coordinator of stress and developmental pathways. *Adv. Exp.Med.Biol.* 2007; 594:78-88

Anckar J, Sistonen L: Regulation of HSF1 Function in the Heat Stress Response: Implications in Aging and Disease. *Annual Review of Biochemistry.* 2011; 80:1089-1115

Antoniades V, Sioga A, Dietrich EM, Meditskou S, Ekonomou L, Antoniades K: Is copper chelation an effective anti-angiogenic strategy for cancer treatment? *Med. Hypotheses.* 2013; 81(6):1159-63

Antonarakis ES, Heath EI, Smith DC, Rathkopf D, Blackford AL, Danila DC. et al. Repurposing itraconazole as a treatment for advanced prostate cancer: a noncomparative randomized phase II trial in men with metastatic castration-resistant prostate cancer. *Oncologist.* 2013;18:163–7323

Araújo WF, Naves MA, Ravanini JN, Schor N, Teixeira VP: Renin-angiotensin system (RAS) blockade attenuates growth and metastatic potential of renal cell carcinoma in mice. *Urol Oncol.* 2015; 33(9):389.e1-7

Aronson JK: Old drugs - new uses. *Br J Clin Pharmacol.* 2007; 64(5):563-565

Arrigo AP, Simon S, Gibertetal B: Hsp27 (HspB1) and α B-crystallin (HspB5) as therapeutic targets. FEBS Letters. 2007; 581(19):3665-3674

Arzneimittelausgaben der gesetzlichen Krankenversicherung (GKV) in den Jahren 1999 bis 2014. Statista 2015: <http://de.statista.com/statistik/daten/studie/152841/umfrage/arzneimittelausgaben-der-gesetzlichen-krankenversicherung-seit-1999> Stand: 23.10.2015)

Ashburn TT, Thor KB. Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. Nat Rev Drug Discov. 2004; 3:673-83

Ashley EA, Recht J, White NJ: Primaquine: the risks and the benefits. Malar J. 2014; 13(1): 418

Auerberg N: Ovarian surface epithelium as a source of ovarian cancers: unwarranted speculation or evidence-based hypothesis? Gyn Oncology. 201; 130(1), 246-251

Aznab M, Rezaei M: Induction, consolidation, and maintenance therapies with arsenic as a single agent for acute promyelocytic leukaemia in a 11-year follow-up. Hematol Oncol. 2015 Aug 27. doi: 10.1002/hon.2253. [Epub ahead of print]

Baird JK, Hoffman SL: Primaquine Therapy for Malaria. Clin Infect Dis. 2004; 39(9):1336-1345

Baldwin AS Jr. The transcription factor NF- κ B and human disease. J Clin Invest. 2001; 107:3-6

Banno K, Iida M, Yanokura M, Irie H, Masuda K, Kobayashi Y, Tominaga E, Aoki D: Drug Repositioning for Gynecologic Tumors: A New Therapeutic Strategy for Cancer. Scientific World Journal. 2015; 2015: 341362

Batchu RB, Gruzdyn OV, Bryant CS, Qazi AM, Kumar S, Chamala S, Kung ST, Sanka RS, Puttagunta US, Weaver DW, Gruber SA: Ritonavir-Mediated Induction of Apoptosis in Pancreatic Cancer Occurs via the RB/E2F-1 and AKT Pathways. Pharmaceuticals (Basel). 2014; 7(1):46-57

Baxter BK, James P, Evans T, Craig EA: SSI1 encodes a novel Hsp70 of the *Saccharomyces cerevisiae* endoplasmic reticulum, Mol. Cell Biol. 1996; 16:6444–6456

Beach LB, Rawson JM, Kim B, Patterson SE, Mansky LM: Novel inhibitors of human immunodeficiency virus type 2 infectivity. J Gen Virol.

2014; 95(12):2778-83

Beccafico S, Morozzi G, Marchetti MC, Riccardi C, Sidoni A, Donato R, Sorci G: Artesunate induces ROS- and p38 MAPK-mediated apoptosis and counteracts tumor growth in vivo in embryonal rhabdomyosarcoma cells. *Carcinogenesis*. 2015 Sep;36(9):1071-83

Berggren MI, Husbeck B, Samulitis B, Baker AF, Gallegos A, Powis G: Thioredoxin per-oxidase-1 (peroxiredoxin-1) is increased in thioredoxin-1 transfected cells and results in enhanced protection against apoptosis caused by hydrogen peroxide but not by other agents including dexamethasone, etoposide, and doxorubicin. *Arch.Biochem.Biophys.* 2001; 392:103-9

Bertolotti A, Zhang Y, Hendershot LM, Harding HP, Ron D: Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat. Cell Biol.* 2000; 2:326–332

Biaglow JE, Miller RA: The Thioredoxin Reductase/Thioredoxin System: Novel Redox Targets for Cancer Therapy. *Cancer Biology & Therapy*. 2005; 4(1):6-13

Bodenner DL, Dedon PC, Keng PC, Katz JC, Borch RF: Selective protection against cis-diamminedichloroplatinum(II)-induced toxicity in kidney, gut, and bone marrow by diethyldithiocarbamate. *Cancer Res*. 1986; 46:2751–2755

Boldt S, Weidle UH, Kolch W: The role of MAPK pathways in the action of chemotherapeutic drugs. *Carcinogenesis* 2002; 23:1831-1838

Borrelli MJ, Bernock LJ, Landry J, Spitz DR, Weber LA, Hickey E, Freeman ML, Corry PM: Stress protection by a fluorescent Hsp27 chimera that is independent of nuclear translocation or multimeric dissociation. *Cell Stress Chaperones*. 2002; 7:281-296

Boulares AH, Yakovlev AG, Ivanova V, Stoica BA, Wang G, Iyer S, Smulson M: Role of Poly(ADP-ribose) Polymerase (PARP) Cleavage in Apoptosis: Caspase-3-Resistant PARP mutant increases rates of apoptosis in transfected cells. *JBiol Chem*. 1999; 274:22932-22940

Braakman I, Helenius J, Helenius A: Role of ATP and disulphide bonds during protein folding in the endoplasmic reticulum. *Nature*. 1992; 356: 260-262

Brancolini C: Inhibitors of the Ubiquitin-Proteasome System and the cell death machinery: How many pathways are activated? *Current Molecular Pharmacology* 2008; 1:24-37

Brem GJ, Mylonas I, Brüning A: Eeyarestatin causes cervical cancer cell sensitization to bortezomib treatment by augmenting ER stress and CHOP expression. *Gynecol Oncol.* 2013; 128(2):383-90

Brocchieri L, Conway de ME, Macario AJ: hsp70 genes in the human genome: Conservation and differentiation patterns predict a wide array of overlapping and specialized functions. *BMC Evolutionary Biol.* 2008; 8:19

Bruey JM, Paul C, Fromentin A, Hilpert S, Arrigo AP, Solary E, Garrido C: Differential regulation of HSP27 oligomerization in tumor cells grown in vitro and in vivo. *Oncogene.* 2000; 19:4855-4863

Brunet Simioni M, De Thonel A, Hammann A, Joly AL, Bossis G, Fourmaux E, Bouchot A, Landry J, Piechaczyk M, Garrido C: Heat shock protein 27 is involved in SUMO-2/3 modification of heat shock factor 1 and thereby modulates the transcription factor activity. *Oncogene.* 2009; 28:3332–3344

Brüning A, Burger P, Vogel M, Rahmeh M, Friese K, Lenhard M, Burges A: Bortezomib treatment of ovarian cancer cells mediates endoplasmic reticulum stress, cell cycle arrest, and apoptosis. *Invest New Drugs.* 2009; 27(6):543-51

Brüning A, Friese K, Burges A, Mylonas I. Tamoxifen enhances the cytotoxic effects of nelfinavir in breast cancer cells. *Breast Cancer Res.* 2010;12:R45

Brüning A, Jückstock J: Misfolded proteins: From little villains to little helpers in the fight against cancer. *Front Oncol.* 2015; 5: 2234-943

Brüning A, Kast R: Oxidizing to death Disulfiram for cancer cell killing. *Cell Cycle.* 2014; 13(10): 1513-1514

Brüning A, Mylonas I: New emerging drugs targeting the genomic integrity and replication machinery in ovarian cancer. *Arch Gynecol Obstet.* 2011; 283:1087-1096

Bryantsev AL, Kurchashova SY, Golyshe SA, Polykakov VY, Wunderink HF, Kanon B, Budagova KR, Kabakov AE, Kampinga HH: Regulation of stress-induced intracellular sorting and chaperone function of

Hsp27(HspB1) in mammalian cells. *Biochem. J.* 2007; 407:407-417

Burges A, Schmalfeldt B: Ovarialkarzinom: Diagnostik und Therapie, *Dtsch Arztebl Int.* 2011; 108(38):635-41

Campillos M, Kuhn M, Gavin AC, Jensen LJ, Bork P: Drug target identification using sideeffect similarity. *Science* 2008; 321:263–6

Carlson KJ, Skates SJ, Singer DE: Screening for ovarian cancer. *Ann Intern Med.* 1994; 121:124

Carr ME, Fandre MN, Oduwa FO: Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in two returning Operation Iraqi Freedom soldiers who developed hemolytic anemia while receiving primaquine prophylaxis for malaria. *Mil Med.* 2005; 170(4):273-6

Casado JL, Machuca I, Bañón S, Moreno A, Moltó J, Rodriguez MA: Raltegravir plus two nucleoside analogues as combination antiretroviral therapy in HIV-infected patients who require cancer chemotherapy. *Antivir Ther.* 2015 doi: 10.3851/IMP2961. (Epub ahead of print)

Caspersen C, Pedersen PS, Treiman M: The sarco/endoplasmic reticulum calcium-ATPase 2b is an endoplasmic reticulum stress-inducible protein. *J. Biol. Chem.* 2000; 275:22363-22372

Chen D, Brayton D, Shahandeh B, Meyskens FL Jr, Farmer PJ: Disulfiram facilitates intracellular Cu uptake and induces apoptosis in human melanoma cells. *J Med.Chem.* 2004; 47:6914-6920

Chen D, Cui QC, Yang H, Dou QP: Disulfiram, a clinically used anti-alcoholism drug and copper-binding agent, induces apoptotic cell death in breast cancer cultures in xenografts via inhibition of the proteasome activity. *Cancer Res.* 2006; 66:10425-10433

Chen D, Dou QP: The ubiquitin-proteasome system as a prospective molecular target for cancer treatment and prevention. *Curr Protein Pept. Sci.* 2010; 11:459-70

Chen D, Milacic V, Frezza M, Dou QP: Metal complexes, their cellular targets and potential for cancer therapy. *Curr. Pharm. Des.* 2009; 15: 777-791

Chen Z, Han ZC: STAT3: a critical transcription activator in angiogenesis. *Med. Res. Rev.* 2008; 28:185-200

Chen Z, Seimiya H, Naito M, Mashima T, Kizaki A, Dan S, Imaizumi M, Ichijo H, Miyazono K, Tsuruo T: ASK1 mediates apoptotic cell death induced by genotoxic stress. *Oncogene.* 1999; 18:173-180

Chiaffarino F, Parazzini F, Decarli A, Franceschi S, Talamini R, Montella M, La Vecchia C: Hysterectomy with or without unilateral oophorectomy and risk of ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.* 2005 May; 97(2):318-22.

Chong CR, Sullivan DJ: New uses for old drugs. *Nature* 2006; 448:645–6

Ciechanover A, Stanhill A: The complexity of recognition of ubiquitinated substrates by the 26S proteasome. *Biochim Biophys Acta.* 2014; 1843(1):86–96

Ciocca DR, Clark GM, Tandon AK, Fuqua SA, Welch WJ, McGuire WL: Heat shock protein hsp70 in patients with axillary lymph node-negative breast cancer: prognostic implications. *J Natl Cancer Inst.* 1993; 85: 570 (a)

Ciocca DR, Oesterreich S, Chamness GC, McGuire WL, Fuqua SA. Biological and clinical implications of heat shock protein 27,000 (Hsp27): a review. *J Natl Cancer Inst.* 1993; 85:1558 (b)

Clarke JP, Mearow KM: Cell Stress Promotes the Association of Phosphorylated HspB1 with F-Actin. *Plos One.* 2013; 8(7): e68978

Clifton AD, Young PR, Cohen P: A comparison of the substrate specificity of MAPKAP kinase-2 and MAPKAP kinase-3 and their activation by cytokines and cellular stress, *FEBS Lett.* 1996; 392:209-214

Clinical Trials. Gov (a): Phase I Study of Disulfiram and Copper Gluconate for the Treatment of Refractory Solid Tumors Involving the Liver. 2014; ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00742911

Clinical Trials. Gov (b): Disulfiram/Copper Combination In The Treatment of Newly Diagnosed Glioblastoma Multiform (GLIODIS). 2014; ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01777919

Clinical Trials. Gov (c): Disulfiram and Chelated Zinc for the Rx of Disseminated Mets Mel That Has Failed First Line Therapy. 2014; ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02101008

Clouser CL, Holtz CM, Mullett M, Crankshaw DL, Briggs JE, O'Sullivan MG, Patterson SE, Mansky LM: Activity of a novel combined antiretroviral therapy of gemcitabine and decitabine in a mouse model for HIV-1. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012; 56(4):1942-8

Connell P, Ballinger CA, Jiang J, Wu Y, Thompson LJ, Hohfeld J, Patterson C: The co-chaperone CHIP regulates protein triage decisions mediated by heat-shock proteins. *Nat. Cell Biol.* 2001;3:93–96

Conticello C, Martinetti D, Adamo L, Buccheri S, Giuffrida R, Parrinello N, Lombardo L, Anastasi G, Amato G, Cavalli M, Chiarenza A, De Maria R, Giustolisi R, Gulisano M, Di Raimondo F: Disulfiram, an old drug with new potential therapeutic uses for human hematological malignancies. *Int. J.Cancer.* 2012; 131:2197-203

Cvek B, Dvorak Z: Targeting of nuclear factor-kappaB and proteasome by dithiocarbamate complexes with metals. *Curr. Pharm.* 2007; 13:3155-67

Cvek B, Dvorak Z: The value of proteasome inhibition in cancer. Can the old drug, disulfiram, have a bright new future as a novel proteasome inhibitor? *Drug Discov. Today.* 2008; 13:716-22

Cvek B: Antabuse (disulfiram) as a pilot case of nonprofit drug. *Int. J. Cancer.* 2010; 127: 2486

D'Amato R, Loughnan MS, Flynn E, Folkman J: Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. *Proc.NatlAcad.Sci.* 1994; 91:4082–4085

Dai C, Whitesell L, Rogers AB, Lindquist S: Heat Shock Factor 1 Is a Powerful Multifaceted Modifier of Carcinogenesis. *Cell.* 2007; 130(6):1005-1018

Davies C, Tournier C: Exploring the function of the JNK (c-Jun N-terminal kinase) signalling pathway in physiological and pathological processes to design novel therapeutic strategies. *Biochemical Society Transactions.* 2012; 40:85-89

De Thonel A, Vandekerckhove J, Lanneau D, Selvakumar S, Courtois G, Hazoume A, Brunet M, Maurel S, Hammann A, Ribeil JA, Zermati Y,

Gabet AS, Boyes J, Solary E, Hermine O, Garrido C: HSP27 controls GATA-1 protein level during erythroid cell differentiation. *Blood*. 2010; 116:85-96

De Wit NJ, Verschuure P, Kappe G, King SM, de Jong WW, van Muijen GN, Boelens WC: Testis-specific human small heat shock protein HSPB9 is a cancer/testis antigen, and potentially interacts with the dynein subunit TCTEL1. *Eur. J. Cell Biol.* 2004; 83:337-345

Della Pepa C, Tonini G, Pisano C, Di Napoli M, Cecere SC, Tambaro R, Facchini G, Pignata S: Ovarian cancer standard of care: are there real alternatives? *Chin J Cancer*. 2015; 34(1):17-27

Delmaestro E, Trombetta LD: The effects of disulfiram on the hippocampus and cerebellum of the rat brain: a study on oxidative stress. *Toxicol.Lett.* 1995; 75, 235-243

Devarbhavi H, Kaese D, Williams AW, Rakela J, Klee GG, Kamath PS: Cancer antigen 125 in patients with chronic liver disease. *MayoClin Proc*. 2002; 77(6):538

Dezwaan DC, Freeman BC: HSP90: the Rosetta stone for cellular protein dynamics? *Cell Cycle*. 2008; 7:1006-1012

Dhanasekaran D, Reddy P: JNK Signaling in Apoptosis. *Oncogene*. 2008; 27(48): 6245-6251

Dietl J: Revisiting the pathogenesis of ovarian cancer: the central role of fallopian tube. *Archives of Gyn and Obs*. 2014; 289(2), 241-246

Diez M, Arroyo M, Cerdan FJ, Munoz M, Martin MA, Balibrea JL: Serum and tissue trace metal levels in lung cancer. *Oncology*. 1989; 46:230-4

Dolcet X, Llobet D, Pallares J, Matias-Guiu X: NF- κ B in development and progression of human cancer. *Virchows Arch*. 2005; 446:475-482

Doran P, Gannon J, O'Connell K, Ohlendieck K: Aging skeletal muscle shows a drastic increase in the small heatshock proteins RB-crystallin/HspB5 and α Hsp/HspB7. *Eur. J. Cell Biol*. 2007; 86:629-640

Dorner AJ, Kaufman RJ: The levels of endoplasmic reticulum proteins and ATP affect folding and secretion of selective proteins. *Biologicals*. 1994; 22:103-112

Doshi BM, Hightower LE, Lee J: HSPB1, actin filament dynamics, and aging cells. *Ann N Y Acad. Sci.* 2010; 1197:76-84

Doshi BM, Hightower LE, Lee J: HSPB1, actin filament dynamics, and aging cells. *Ann N Y Acad. Sci.* 2010; 1197:76-84

Doshi BM, Hightower LE, Lee J: The role of Hsp27 and actin in the regulation of movement in human cancer cells responding to heat shock. *Cell Stress Chaperones.* 2009; 14:445–457

Drake MT, Clarke BL, Khosla S: Bisphosphonates: mechanism of action and role in clinical practice. *Mayo Clin Proc.* 2008;83(9):1032-45

Dueñas-González A, García-López P, Herrera LA, Medina-Franco JL, González-Fierro A, Candelaria M: The prince and the pauper. A tale of anticancer targeted agents, *Molecular Cancer* 2008; 7:82

During RL, Gibson BG, Li W, Bishai EA, Sidhu GS, Landry J, Southwick FS: Anthrax lethal toxin paralyzes actin-based motility by blocking Hsp27 phosphorylation. *Embo J.* 2007; 26:2240-2250

Elmore S: Apoptosis: a review of programmed cell death. *ToxicolPathol.* 2007; 35:495-516

Engeland A, Tretli S, Bjorge T: Height, body mass index, and ovarian cancer: a follow-up of 1.1 million Norwegian women. *J Natl Cancer Inst.* 2003; 95:1244

Fachinformation des Arzneimittel-Kompendium der Schweiz®: Antabus®, Wirkstoff: Disulfiram, Stand: 15.07.2014

Fairfield KM, Hunter DJ, Colditz GA, Fuchs CS, Cramer DW, Speizer FE, Willett WC, Hankinson SE: A prospective study of dietary lactose and ovarian cancer. *Int J Cancer* 2004; 110: 271–277

Fairfield KM, Willett WC, Rosner BA, Manson JE, Speizer FE, Hankinson SE: Obesity, weight gain, and ovarian cancer. *Obstet.Gynecol* 2002; 100(2):288-96

Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F: GLOBOCAN 2012, Cancer

Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11

Fletcher I: Review of the treatment of thalidomide children with limb deficiency in Great Britain. *Clin.Orthop.Relat Res.* 1980; 148:18–25

Flynn GC, Chappell TG, Rothman JE: Peptide binding and release by proteins implicated as catalysts of protein assembly. *Science.* 1989; 245:385–390

Flynn GC, Pohl J, Flocco MT, Rothman JE: Peptidebinding specificity of the molecular chaperone BiP, *Nature.* 1991; 353:726–730

Fontaine JM, Rest JS, Welsh MJ, Benndorf R: The sperm outer dense fiber protein is the 10th member of the superfamily of mammalian small stress proteins. *Cell Stress Chaperones* 2003; 8:62-69

Fornace AJ Jr, Alamo I Jr, Hollander MC: DNA damage-inducible transcripts in mammalian cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.*1988; 85:8800-8804

Fourie AM, Peterson PA, Yang Y: Characterization and regulation of the major histocompatibility complex encoded proteins Hsp70-Hom and Hsp70-1/2. *Cell Stress Chaperones.* 2001; 6:282–295

Frangoulis M, Georgiou P, Chrisostomidis C, Perrea D, Dontas I, Kavantzias N, Kostakis A, Papadopoulos O: Rat epigastric flap survival and VEGF expression after local copper application. *Plast.Reconstr. Surg.* 2007; 119(3):837-43

Frezza M, Schmitt S, Dou QP: Targeting the ubiquitin-proteasom pathway: an emerging concept in cancer therapy. *Curr. Top Med. Chem.* 2011; 11:2888-905

Friant S, Meier KD, Riezman H: Increased ubiquitin-dependent degradation can replace the essential requirement for heat shock protein induction. *EMBO J.* 2003; 22:3783-3791

Fu W, Ma L, Chu B, Wang X, Bui MM, Gemmer J, Altiock S, Pledger WJ: The Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor SCH 727965 (Dinacliclib) induces the Apoptosis of Osteosarcoma Cells. *MolCancerTher.* 2011; 10:1018-1027

Fujimoto M, Nakai A: The heat shock factor family and adaptation to proteotoxic stress. *FEBS J.* 2010; 277:4112-4125

Fujino G, Noguchi T, Matsuzawa A, Yamauchi S, Saitoh M, Takeda K, Ichijo H. Thioredoxin and TRAF family proteins regulate reactive oxygen species-dependent activation of ASK1 through reciprocal modulation of the N-terminal homophilic interaction of ASK1. *Mol Cell Biol.* 2007; 27:8152–8163

Galluzzi L, Vitale I, Senovilla L, Eisenberg T, Carmona-Gutierrez D, Vacchelli E, Robert T, Ripoche H, Jägemann N, Paccard C, Servant N, Hupé P, Lazar V, Dessen P, Barillot E, Zischka H, Madeo F, Kroemer G: Independent transcriptional reprogramming and apoptosis induction by cisplatin. *Cell Cycle.* 2012; 11(18): 3472–3480.

Gandin V, Fernandes AP, Rigobello MP, Dani B, Sorrentino F, Tisato F, Bjornstedt M, Bindoli A, Sturaro A, Rella R, Marzano C: Cancer cell death induced by phosphine gold (I) compounds targeting thioredoxinreductase. *Biochem Pharmacol.* 2010; 79:90-101

Garrido C, Brunet M, Didelot C, Zermati Y, Schmitt E, Kroemer G: Heat shock proteins 27 and 70: anti-apoptotic proteins with tumorigenic properties. *Cell Cycle.* 2006; 5: 592-2601

Garrido C, Schmitt E, Candé C, Vahsen N, Parcellier A, Kroemer G: Spotlight on heat shock proteins: HSP 27 and HSP 70 potentially oncogenic apoptosis inhibitors. *Cell Cycle* 2003; 2:579-584

Garrido C, Solary E: A role of HSPs in apoptosis through "protein triage"? *Cell Death Differ.* 2003; 10:619–620

Garrido C: Size matters: of the small HSP and its large Oligomers. *Cell Death Differ* 2002; 9:483-5

Glickman MH, Ciechanover A: The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: Destruction for the sake of construction. *Physiol. Rev.* 2002; 82:373-428

Goldberg AL: Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature.* 2003; 426:895-899

Goldstein LJ: MDR1 gene expression in solid tumours. *Eur J Cancer*

1996; 6:1039–50

Goloudina AR, Demidov ON, Garrido C: Inhibition of HSP70: a challenging anti-cancer strategy. *Cancer Lett.* 2012; 325:117-24

Granato M, Santarelli R, Lotti LV, Di Renzo L, Gonnella R, Garufi A, Trivedi P, Frati L, D'Orazi G, Faggioni A, Cirone M: JNK and Macroautophagy Activation by Bortezomib has a Pro-Survival Effect in Primary Effusion Lymphoma Cells. *Plos One.* 2013; 8(9):e75965

Greer S, Honeywell R, Geletu M, Arulanandam R, Raptis L: Housekeeping genes; expression levels may change . *J ImmunolMethods.* 2010; 355(1–2):76-9

Gros P, Ben Neriah YB, Croop JM, Housman DE: Isolation and expression of a complementary DNA that confers multidrug resistance. *Nature* 1986; 323:728–31

Guidi F, Landini I, Puglia M, Magherini F, Gabbiani C, Cinellu MA, Nobili S, Fiaschi T, Bini L, Mini E, Messori L, Modesti A: Proteomic analysis of ovarian cancer cell responses to cytotoxic gold compounds. *Metallomics.* 2012; 4:307-14

Guo S, Wharton W, Moseley P, Shi H: Heat shock protein 70 regulates cellular redox status by modulating glutathione-related enzyme activities. *Cell Stress Chaperones.* 2007; 12: 245–254

Guo X, Xu B, Pandey S, Goessl E, Brown J, Armesilla AL, Darling JL, Wang W: Disulfiram/copper complex inhibiting NFkappaB activity and potentiating cytotoxic effect of gemcitabine on colon and breast cancer cell lines. *Cancer Lett.* 2010; 290:104-13

Gusev NB, Bogatcheva NV, Marston SB: Structure and properties of small heat shock proteins (sHsp) and their interaction with cytoskeleton proteins. *Biochemistry.* 2002; 67(5):511–519

Habib FK, Dembinski TC, Stitch SR: The zinc and copper content of blood leucocytes and plasma from patients with benign and malignant prostates. *Clin.Chim.Acta.* 1980; 104(3):329-35

Hacker MP, Ershler WB, Newman RA, Gamelli RL: Effect of disulfiram (tetraethylthiuramdisulfide) and diethyldithiocarbamate on the bladder toxicity and antitumor activity of cyclophosphamide in mice. *Cancer Res.*

1982; 42: 4490–4494

Hahn KL: Old Drugs Are New Again. PharmD, CPE, DAAPM. 2011

Hamilton TG, Norris TB, Tsuruda PR, Flynn GC: Cer1pfunctions as a molecular chaperone in the endoplasmic reticulum of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 1999; 19:5298-5307

Harding HP, Calton M, Urano F, Novoa I, Ron D: Transcriptional and translational control in the mammalian unfolded protein response. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* 2002; 18:575–599

Harmsen MG, Arts-de Jong M, Hoogerbrugge N, et al. Early salpingectomy (TUBectomy) with delayed oophorectomy to improve quality of life as alternative for risk-reducing salpingo-oophorectomy in *BRCA1/2* mutation carriers (TUBA study): a prospective non-randomised multicentre study. *BMC Cancer.* 2015; 15:593

Hatakeyama S, Nakayama KI: U-box proteins as a new family of ubiquitin ligases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003; 302:635-645

Healy SJM, Gorman AM, Mousavi-Shafaei P, Gupta S, Samali A: Targeting the endoplasmic reticulum-stress response as an anticancer strategy. *European Journal of Pharmacology.* 2009; 625:234-46

Hetz C: The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nat.Rev.Mol.Cell.Biol.* 2012; 13:89-102

Higgins CF: ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol* 1992; 8:67–113

Hirano T, Ishihara K, Hibi M: Roles of STAT3 in mediating the cell growth, differentiation and survival signals relayed through the IL-6 family of cytokine receptors. *Oncogene.* 2000; 19:2548-2556

Hogarth, G. In: *Progress in Inorganic Chemistry*; Kenneth. D. Karlin, Ed; John Wiley & Sons, Inc.: NJ, USA, 2005; Vol. 53, S. 71-561

Howlander N, Noone AM, Krapcho M, Neyman N, Aminou R, Waldron W, Altekruse SF, Kosary CL, Ruhl J, Tatalovich Z, Cho H, Mariotto A, Eisner MP, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA, Edwards BK: *SEER Cancer Statistics Review, 1975-2008*, National Cancer Institute 2010

http://seer.cancer.gov/csr/1975_2008 Stand 21.08.2013

Hsu PP, Sabatini DM: Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. *Cell*. 2008; 134:703.7

<http://globocan.iarc.fr> Stand: 23.08.2013

http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2012/kid_2012_c56.html, Stand: 19.08.2013

Huang Y, Carbone DP: Mechanisms of and Strategies for Overcoming Resistance to Anti-vascular Endothelial Growth Factor Therapy in Non-small Cell Lung Cancer. *Biochim. Biophys Acta*. 2015; S0304-419X (15)00004-9

Huang JK, Chang HT, Chou CT, Shu SS, Kuo CC, Tsai JY, Liao WC, Wang JL, Lin KL, Lu YC, Chen IS, Liu SI, Ho CM, Jan CR: The mechanism of sertraline-induced Ca²⁺ rise in human PC3 prostate cancer cells. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2011;109(2):103–10

Huang YL, Sheu JY, Lin TH: Association between oxidative stress and changes of trace elements in patients with breast cancer. *Clin.Biochem*. 1999; 32:131-6

Imaoka I, Wada A, Kaji Y et al.: Developing an MR imaging strategy for diagnosis of ovarian masses. *Radiographics*2006; 26(5): 1431-1448 (OriginalzitatausInterdisziplinäres Management des Ovarialkarzinoms)

Inoshita S, Takeda K, Hatai T, Terada Y, Sano M, Hata J, Umezawa A, Ichijo H: Phosphorylation and inactivation of myeloid cell leukemia 1 by JNK in response to oxidative stress. *J Biol Chem*. 2002; 277(46):43730-43734

Ito H, Kamei K, Iwamoto I, Inaguma Y, Nohara D, Kato K: Phosphorylation-induced change of the ligomerizationstate of RB-crystallin. *J. Biol. Chem*.2001; 276: 5346-5352

Jaattela M: Escaping cell death: survival proteins in cancer. *Exp Cell Res*. 1999; 248:30 (a)

Jaattela M: Heat shock proteins as cellular lifeguards. *Ann Med*. 1999; 31:261 (b)

Jäger R, Bertrand MJ, Gorman AM, Vandenabeele P, Samali A: The unfolded protein response at the crossroads of cellular life and death during endoplasmic reticulum stress. *Biol.Cell.* 2012; 104:259-70

Jamieson JD, Palade GE: Intracellular transport of secretory proteins in the pancreatic exocrine cell. IV. Metabolic requirements. *J. Cell Biol.* 1968; 39:589–603

Jariel-Encontre I, Bossis G, Piechaczyk M: Ubiquitin-independent degradation of proteins by the proteasome. *Biochim. Biophys. Acta.* 2008; 1786:153-177

Jiang J, Ballinger CA, Wu Y, Dai Q, Cyr DM, Hohfeld J, Patterson C: CHIP is a U-box-dependent E3 ubiquitin ligase: identification of Hsc70 as a target for ubiquitylation. *J. Biol. Chem.* 2001; 276:42938-42944

Jiang X, Sun L, Qiu JJ, Sun X, Li S, Wang X, So CW, Dong S: A novel application of furazolidone: anti-leukemic activity in acute myeloid leukemia. *PLoS One.* 2013 Aug 9;8(8)

Jin M, Shen X, Zhao C, Qin X, Liu H, Huang L, Qiu Z, Liu Y: In vivo study of effects of artesunate nanoliposomes on human hepatocellular carcinoma xenografts in nude mice. *Drug Deliv.* 2013;20(3-4):127–33.

Johansson B, Stankiewicz Z: Bis-(diethyldithiocarbamate) copper complex: a new metabolite of disulfiram? *Biochem.Pharmacol.* 1985; 34: 2989-2991

Johansson B: A review of the pharmacokinetics and pharmacodynamics of disulfiram and its metabolites. *Acta Psychiatr.Scand.Suppl.* 1992; 369:15-26

Johnson DE: The ubiquitin-proteasome system: opportunities for therapeutic intervention in solid tumors. *Endocr Relat Cancer.* 2015; 22(1):1–17

Johnston JA, Ward CL, Kopito RR: Aggresomes: A Cellular Response to Misfolded Proteins. *J Cell Biol.* 1998; 143(7):1883-1898

Jolly C, Morimoto RI: Role of the heat shock response and molecular chaperones in oncogenesis and cell death. *J. Natl. Cancer Inst.* 2000; 92:1564–1572

Jørgensen CH, Pedersen B, Tønnesen H: The efficacy of disulfiram for the treatment of alcohol use disorder. *Alcohol.Clin.Exp.Res.* 2011;35:1749-58

Kaiser M, Mäser P, Tadoori LP, Ioset JR, Brun R1: Antiprotozoal Activity Profiling of Approved Drugs: A Starting Point toward Drug Repositioning. *PLoS One.* 2015; 10(8)

Kaitin KI: Deconstructing the drug development process: the new face of innovation. *ClinPharmacolTher.* 2010; 87:356-61

Kakigano A, Tomimatsu T, Mimura K, Kanayama T, Fujita S, Minato K, Kumasawa K, Taniguchi Y, Kanagawa T, Endo M, Ishihara T, Namba T, Mizushima T, Kimura T: Drug Repositioning for Preeclampsia Therapeutics by In Vitro Screening: Phosphodiesterase-5 Inhibitor Vardenafil Restores Endothelial Dysfunction via Induction of Placental Growth Factor. *Reprod Sci.* 2015 Mar 2. pii: 1933719115574340. [Epub ahead of print]

Karin M, Ben-Neriah Y: Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. *Annu. Rev. Immunol.* 2000; 18:621–663)

Kast RE, Belda-Iniesta C: Suppressing glioblastoma stem cell function by aldehyde dehydrogenase inhibition with chloramphenicol or disulfiram as a new treatment adjunct: an hypothesis. *Curr. Stem Cell Res. Ther.* 2009; 4(4):314-7

Kast RE, Boockvar AJ, Brüning A, Cappello F, Chang WW, Cvek B, Dou QP, Duenas-Gonzalez A, Efferth T, Focosi D, Ghaffari SH, Karpel-Massler G, Ketola K, Khoshnevisan A, Keizman D, Magné N, Marosi C, McDonald K, Muñoz M, Paranjpe A, Pourgholami MH, Sardi I, Sella A, Srivenugopal KS, Tuccori M, Wang W, Wirtz CR, Halatsch ME: A conceptually new treatment approach for relapsed glioblastoma: Coordinated undermining of survival paths with nine repurposed drugs (CUSP9) by the International Initiative for Accelerated Improvement of Glioblastoma Care. *Oncotarget* 2013; 4(4)

Kast RE, Karpel-Massler G, Halatsch ME: CUSP9* treatment protocol for recurrent glioblastoma: aprepitant, artesunate, auranofin, captopril, celecoxib, disulfiram, itraconazole, ritonavir, sertraline augmenting continuous low dose temozolomide. *Oncotarget.* 2014;5(18):8052-82

Kast RE. Glioblastoma: synergy of growth promotion between CCL5 and NK-1R can be thwarted by blocking CCL5 with miraviroc, an FDA

approved anti-HIV drug and blocking NK-1R with aprepitant, an FDA approved anti-nausea drug. *J Clin Pharm Ther.* 2010;35(6):657–63

Kaur J, Ralhan R: Differential expression of 70-kDa heat shock-protein in human oral tumorigenesis. *Int J Cancer* 1995; 63:774

Keiser MJ, Setola V, Irwin JJ, Laggner C, Abbas AI, Hufeisen SJ, Jensen NH, Kuijter MB, Matos RC, Tran TB, Whaley R, Glennon RA, Hert J, Thomas KL, Edwards DD, Shoichet BK, Roth BL: Predicting new molecular targets for known drugs. *Nature* 2009;462:175–81. .

Kelland LR: Preclinical perspectives on platinum resistance. *Drugs.* 2000; 59:1-8)

Kim DJ, Kim J, Spaunhurst K, Montoya J, Khodosh R, Chandra K, Open-Label, Exploratory Phase II Trial of Oral Itraconazole for the Treatment of Basal Cell Carcinoma. *J Clin Oncol.* 2014

Kim NH, Park HJ, Oh MK, Kim IS: Antiproliferative effect of gold (I) compound auranofin through inhibition of STAT3 and telomerase activity in MDA-MB 231 human breast cancer cells. *BMB Rep.* 2013; 46(1):59-64

Kisselev AF, van der Linden WA, Overkleeft HS: Proteasome inhibitors: an expanding army attacking a unique target. *Chem Biol.* 2012; 19(1):99–115

Kline MP, Morimoto RI: Repression of heat shock factor 1 transcriptional activation domain in modulated by constitutive phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.* 1997; 17:2107-15

Knobloch J, Ruther U: Shedding light on an old mystery: thalidomide suppresses survival pathways to induce limb defects. *Cell Cycle* 2008; 7(9):1121–1127

Kostenko S, Moens U: Heat shock protein 27 phosphorylation: kinases, phosphatases, functions and pathology. *Cell. Mol. Life Sci.* 2009; 66:3289–3307

Krebs in Deutschland 2003-2004. Häufigkeit und Trends. 6th revised edition. Robert- Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland. e.V. (ed). Berlin 2008

Kreienberg A, du Bois A, Pfisterer J, Schindelmann S, Schmalfeld B: Management des Ovarialkarzinoms-Interdisziplinäres Vorgehen, Springer

Medizin Verlag Heidelberg 2009

Krestnikova N, Stulpinas A, Imbrasaitė A, Sinkeviciute G, Kalvelyte AV: JNK implication in adipocyte-like cell death induced by chemotherapeutic drug cisplatin. *J Toxicol Sci.* 2015; 40(1):21-32

Krishna S, Ganapathi S, Ster IC, Saeed ME, Cowan M, Finlayson C, Kovacsevics H, Jansen H, Kremsner PG, Efferth T, Kumar D: A Randomised, Double Blind, Placebo-Controlled Pilot Study of Oral Artesunate Therapy for Colorectal Cancer. *EBioMedicine.* 2014 Nov 15;2(1):82-90

Kroemer G, Pouyssegur J: Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. *Cancer Cell.* 2008; 13:472–82

Kubiczkova L, Pour L, Sedlarikova L, Hajek R, Sevcikova S: Proteasome inhibitors – molecular basis and current perspectives in multiple myeloma. *J Cell Mol Med.* 2014; 18(6):947–61

Kumar P, Ambasta RK, Veereshwarayya V, Rosen KM, Kosik KS, Band H, Mestrlil R, Patterson C, Querfurth HW: CHIP and HSPs interact with β -APP in a proteasome-dependent manner and influence A β metabolism. *Human Molecular Genetics.* 2007; 16:848 – 864

Kuo HW, Chen SF, Wu CC, Chen DR, Lee JH: Serum and tissue trace elements in patients with breast cancer in Taiwan. *Biol. Trace Elem. Res.* 2002; 89:1-11

Kurman RJ und Shih le M: The Origin and Pathogenesis of Epithelial Ovarian Cancer- a Proposed Unifying Theory. *The American journal of surgical pathology.* 2010;34(3):433-443

Kurman RJ und Shih le M: Molecular pathogenesis and extraovarian origin of epithelial ovarian cancer-shifting the paradigm. *Human Pathology.* 2011; 42(7): 918-931

Lambert H, Charette SJ, Bernier AF, Guimond A, Landry J: Hsp 27 multimerization mediated by phosphorylation-sensitive intermolecular interactions at the amino acid terminus, *J Biol Chem.* 1999; 274:9378-9385

Landen CN Jr, Goodman B, Katre AA, Steg AD, Nick AM, Stone RL, Miller LD, Mejia PV, Jennings NB, Gershenson DM, Bast RCJr, Coleman RL, Lopez-Berestein G, Sood AK: Targeting aldehyde dehydrogenase cancer stem cells in ovarian cancer. *Mol Cancer Ther.* 2010; 9:3186-3199

Langtry HD, Markham A: Sildenafil: a review of its use in erectile dysfunction. *Drugs* 1999; 57:967-989

Lanneau D, Wettstein G, Bonniaud P, Garrido C: Heat Shock Proteins: Cell Protection through Protein Triage. *The Scientific World Journal.* 2010; 10:1543-1552

Lee AS: GRP78 induction in cancer: therapeutic and prognostic implications. *Cancer Res.* 2007; 67:3496-9

Lee AS: The glucose-regulated proteins: stress induction and clinical applications. *Trends Biochem.Sci.* 2001; 26:504–510

Lee JG, Ahn JH, Kim TJ, Lee JH, Choi JH: Mutant p53 promotes ovarian cancer cell adhesion to mesothelial cells via integrin β 4 and Akt signals. *Sci Rep.* 2015; 5:12642

Lehnert M: Clinical multidrug resistance in cancer: a multifactorial problem. *Eur J Cancer* 1996; 6:912–20

Lewis DJ, Deshmukh P, Tedstone AA, Tuna F, O'Brien P: On the interaction of copper (II) with Disulfiram. *Chem. Commun.* 2014; 50(87):13334-7

Lewis EF: Spontaneous regression of breast cancer. *Prog.Clin.Biol.Res.* 1977; 12:47-53

Lipford JR, Smith GT, Chi Y, Deshaies RJ: A putative stimulatory role for activator turnover in gene expression. *Nature.* 2005; 438:113-116

Liu C, Liu Z, Li M, Li X, Wong YS, Ngai SM, Zheng W, Zhang Y, Chen T: Enhancement of Auranofin-Induced Apoptosis in MCF-7 Human Breast Cells by Selenocystine, a Synergistic Inhibitor of Thioredoxin Reductase. *Plos One.* 2013; 8(1):e53945

Liu P, Brown S, Goktug T, Channathodiyil P, Kannappan V, Hugnot JP, Guichet PO, Bian X, Armesilla AL, Darling JL, Wang W: Cytotoxic effect of disulfiram/copper on human glioblastoma cell lines and ALDH-positive cancer-stem-like cells. *British Journal of Cancer*. 2012; 107:1488–1497

Liu P, Kumar IS, Brown S, Kannappan V, Tawari PE, Tang JZ, Jiang W, Armesilla AL, and Darling JL, Wang W: Disulfiram targets cancer stem-like cells and reverses resistance and cross-resistance in acquired paclitaxel-resistant triple-negative breast cancer cells. *British Journal of Cancer*. 2013; 109:1876–1885

Liu Y, Cui YF: Synergism of cytotoxicity effects of triptolide and artesunate combination treatment in pancreatic cancer cell lines. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2013;14(9):5243–8.

Longman R: Pharmaceutical strategies: jumpstart to products. *In Vivo* 2004; 22:17

Loo TW, Clarke DM, Blockage of drug resistance in vitro by disulfiram, a drug used to treat alcoholism. *J.Natl.Cancer Inst*. 2000; 92:898-902

Lövborg H, Oberg F, Rickardson L, Gullbo J, Nygren P, Larsson R: Inhibition of proteasome activity, nuclear factor-Kappa B translocation and cell survival by the antialcoholism drug disulfiram. *Int. J. Cancer*. 2006; 118:1577-1580

Lüllmann H, Mohr K, Hein L: *Pharmakologie und Toxikologie*. S.69-70, S.575, 17. Auflage, Georg Thieme Verlag, 2010

Lv ZM, Chen L, Tang J: Nebulized lidocaine inhalation in the treatment of patients with acute asthma. *World J Emerg Med*. 2011;2(1):30-2

Ma Y, Brewer JW, Diehl JA, Hendershot LM: Two distinct stress signaling pathways converge on the CHOP promoter during the mammalian unfolded protein response. *J. Mol. Biol*. 2002; 318:1351–1365

Ma Y, Hendershot LM: The role of the unfolded protein response in tumour development: friend or foe? *Nature Reviews Cancer*. 2004; 4:966-977

Madeira JM, Gibson DL, Kean WF, Klegeris A: The biological activity of auranofin: implications for novel treatment of diseases. *Inflammopharmacology*. 2012; 20(6):297-306.

Malden NJ, Pai AY: Oral bisphosphonate associated osteonecrosis of the jaws: three case reports. *British Dental Journal*. 2007; 203:93-97

Malhotra JD, Kaufman RJ: The endoplasmicreticulum and the unfolded protein response. *Semin.CelDev.Biol*. 2007; 18:716-31

Malhotra JD, Miao H, Zhang K, Wolfson A, Pennathur S, Pipe SW, Kaufman RJ:Antioxidants reduce endoplasmic reticulum stress and improve protein secretion. *Proc.Natl.Acad.Sci*. 2008; 105:18525-18530

Marx RE: Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. *J Oral Maxillofac Surg*. 2003; 61(9):1115-7

Marzano C, Gandin V, Folda A, Scutari G, Bindoli A, Rigobello MP: Inhibition of thioredoxinreductase by auranofin induces apoptosis in cisplatin-resistant human ovarian cancer cells. *Free Radic. Biol. Med*. 2007; 42:872-881

Matsuzawa A, Ichijo H: Molecular mechanisms of the decision between life and death: regulation ofapoptosis by apoptosis signal-regulating kinase 1. *J Biochem*. 2001; 130:1-8

Mayer MP, Bukau B: Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism. *Cell. Mol. Life Sci*. 2005; 62:670–684

McAuslan BR, Reilly W: Endothelial cell phagokinesis in response to specific metal ions. *Exp. Cell Res*. 1980; 130(1):147-57

McClellan AJ, Xia Y, Deutschbauer AM, Davis RW, Gerstein M, Frydman J:Diverse cellular functions of the Hsp90 molecular chaperone uncovered using systems approaches.*Cell*. 2007; 131:121-35

McGuire V, Felberg A, Mills M, Ostrow KL, DiCioccio R, John EM, West DW, WhittemoreAS:Relation of contraceptive and reproductive history to ovarian cancer risk in carriers and non-carriers of BRCA1 gene mutations. *Am J Epidemiol*. 2004; 1:160(7):613-8

Mercier PA, Winegarden NA, Westwood JT: Human heat shock factor 1 is predominantly anuclear protein before and after heat stress. *J. Cell Sci*. 1999; 112:2765-74

Mestres J, Gregori-Puigjané E, Valverde S, Solé RV: Data completeness - the Achilles heel of drug-target networks. *Nat Biotechnol.* 2008; 26:983–4

Mestres J, Seifert SA, Oprea TI: Linking pharmacology to clinical records: cyclobenzaprine and its possible association with serotonin syndrome. *ClinPharmacolTher.* 2011; 90:662–5

Michels AA, Kanon B, Konings AW, Ohtsuka K, Bensaude O, Kampinga HH: Hsp70 and Hsp40 chaperone activities in the cytoplasm and the nucleus of mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 1997; 272:33283-33289

Mignogna MD, Fedele S, Lo Russo L: The World Cancer Report and the burden of oral cancer. *Eur J Cancer Prev.* 2004; 13:139-142

Mirkovic B, Renko M, Turk S, Sosic I, Jevnikar Z, Obermajer N. et al. Novel mechanism of cathepsin B inhibition by antibiotic nitroxoline and related compounds. *ChemMedChem.* 2011; 6:1351–6

Mitch WE, Goldberg AL: Mechanisms of muscle wasting: The role of the ubiquitin-proteasome system. *N Engl. J Med.* 1996; 335:1897-1905

Mitsubishi A, Kiyokawa T, Sato Y, Shozu M: Effects of metformin on endometrial cancer cell growth in vivo: a preoperative prospective trial. *Cancer.* 2014 Oct 1;120(19):2986-95

Morimoto RI: Proteotoxic stress and inducible chaperone networks in neurodegenerative disease and aging. *Genes Dev.* 2008; 22:1427-1438

Mounier N, Arrigo AP: Actin cytoskeleton and small heat shock proteins: how do they interact? *Cell Stress Chaperones.* 2002; 7(2):167-176

Munos B: Lessons from 60 years of pharmaceutical innovation. *Nature Rev Drug Discov.* 2009; 8:959–68

Munoz M, Covenas R, Esteban F, Redondo M: The substance P/NK-1 receptor system: NK-1 receptor antagonists as anti-cancer drugs. *J Biosci.* 2015; 40(2):441-63

Munoz M, González-Ortega A, Salinas-Martín MV, Carranza A, Garcia-Recio S, Almendro V, Coveñas R: The neurokinin-1 receptor antagonist aprepitant is a promising candidate for the treatment of breast cancer. *Int J Oncol.* 2014 Oct;45(4):1658-72

Murata S, Minami Y, Minami M, Chiba T, Tanaka K: CHIP is a chaperone-dependent E3 ligase that ubiquitylates unfolded protein. *EMBO Rep.* 2001; 2:1133–1138

Nagai H, Noguchi T, Takeda K, Ichijo H. Pathophysiological roles of ASK1-MAP kinase signaling pathways. *J Biochem.Mol Biol.* 2007; 40:1-6

Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA, Yuan J: Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature.* 2002; 403:98–103

Nayak SB, Bhat VR, Upadhyay D, Udupa SL: Copper and ceruloplasmin status in serum of prostate and colon cancer patients. *Indian J Physiol. Pharmacol.* 2003; 47:108-10

Nechushtan H, Hamamreh Y, Nidal S, Gotfried M, Baron A, Shalev YI, Nisman B, Peretz T, Ramua NP: A Phase IIb Trial Assessing the Addition of Disulfiram to Chemotherapy for the Treatment of Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer. *The Oncologist.* 2015; 20(4):366-367

Nelson L, Lewin N, Howland MA, Hoffman R, Goldfrank L, Flomenbaum N: *Goldfrank's Toxicologic Emergencies*, 9th ed. McGraw-Hill: New York, 2010

New L, Jiang Y, Zhao M, Liu K, Zhu, Flood LJ, Kato Y, Parry GC, Han J: PRAK, a novel protein kinase regulated by the p38 MAP kinase, *EMBO J.* 1998; 17:3372-3384

Nishinaka Y, Nakamura H, Masutani H, Yodoi J: Redox control of cellular function by thioredoxin: A new therapeutic direction in host defense. *Arch.Immunol.Ther. Exp.* 2001; 49:285-92

Nishitoh H, Matsuzawa A, Tobiume K, Saegusa K, Takeda K, Inoue K, Hori S, Kakizuka A, Ichijo H: ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats. *Genes.Dev.* 2002; 16:1345-1355

Nishitoh H: CHOP is a multifunctional transcription factor in the ER stress response. *J Biochem.* 2012; 151:217-9

Nobili S, Mini E, Landini I, Gabbiani C, Casini A, Messori L: Gold compounds as anticancer agents: chemistry, cellular pharmacology, and

preclinical studies. *Med. Res. Rev.* 2010; 30, 550-580

O'Brien A, Barber JEB, Reid S, Niknejad N, Dimitroulakos J: Enhancement of Cisplatin Cytotoxicity by Disulfiram Involves Activating Transcription Factor 3. *Anitcanc. Res.* 2012; 32:2679-2688

Obeng EA, Carlson LM, Gutman DM, Harrington WJ, Lee KP, Boise LH. Proteasome inhibitors induce a terminal unfolded protein response in multiple myeloma cells. *Blood.* 2006;107(12):4907-4916

Oh C, Yoon JH, Park S, Yoo YJ: Simultaneous quantification of total and conjugated ubiquitin levels in a single immunoblot. *Anal Biochem.* 2013; 2697: 0441-7

Oprea TI, Bauman JE, Bologa CG, Buranda T, Chigaev A, Edwards BS, Jarvik JW, Gresham HD, Haynes MK, Hjelle B, Hromas R, Hudson L, Mackenzie DA, Muller CY, Reed JC, Simons PC, Smagley Y, Strouse J, Surviladze Z, Thompson T, Ursu O, Waller A, Wandinger-Ness A, Winter SS, Wu Y, Young SM, Larson RS, Willman C, Sklar LA: Drug repurposing from an academic perspective. *Drug Discov Today: Therap Strategies* 2011; 8:61–69

Oprea TI, Mestres J: Drug Repurposing: Far beyond new targets for old drugs, *AAPS Journals* 2012; 14:4

Oyadomari S, Mori M: Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress; *Cell Death and Differentiation.* 2004; 11:381-389

Padhy BM, Gupta YK: Drug repositioning: Re-investigating existing drugs for new therapeutic indications. *Journ Postgrad Med.* 2011; 57(2): 153-160

Pan Q, Kleer CG, van Golen KL, Irani J, Bottema KM, Bias C, De Carvalho M, Mesri EA, Robins DM, Dick RD, Brewer GJ, Merajver SD: Copper deficiency induced by tetrathiomolybdate suppresses tumor growth and angiogenesis. *Cancer Res.* 2002; 62(17):4854-9

Pan SY, Ugnat AM, Mao Y, Wen SW, Johnson KC: Association of cigarette smoking with the risk of ovarian cancer. *Int J Cancer* 2004; 111:124

Parcellier A, Brunet M, Schmitt E, Col E, Didelot C, Hammann A, Nakayama K, Nakayama KI, Khochbin S, Solary E, Garrido C: HSP27

favors ubiquitination and proteasomal degradation of p27Kip1 and helps S-phase reentry in stressed cells. *FASEB J.* 2006; 20:1179–1181

Parcellier A, Gurbuxani S, Schmitt E, Solary E, Garrido C: Heat shock proteins, cellular chaperons that modulate mitochondrial cell death pathways. *BiochemBiophys Res Commun.*2003; 304:505-12

Parcellier A, Schmitt E, Gurbuxani S, Seigneurin-Berny D, Pance A, Chantome A, Plenchette S, Khochbin S, Solary E, Garrido C: HSP27 is a ubiquitin-binding protein involved in I-kappaBalphaproteasomal degradation. *Mol.Cell.Biol.* 2003; 23:5790-5802

Parmar VM, Schroder M: Sensing endoplasmic reticulum stress.*Adv.Exp.Med.Biol.*2012; 738:153–68

Patchala J, Jegga AG: Concept Modeling-based Drug Repositioning. *AMIA Jt Summits Transl Sci Proc.* 2015; 2015: 222–226

Pennuto M, Tinelli E, Malaguti M, Del Carro U, D'Antonio M, Ron D: Ablation of the UPR-mediator CHOP restores motor function and reduces demyelination in Charcot-Marie-Tooth 1B mice. *Neuron.* 2008; 57:393–405

Pickart CM: Back to the future with ubiquitin. *Cell.* 2004; 116:181-190, 2004

Pivovarova AV, Mikhailova VV, Chernik IS, Chebotareva NA, Levitsky DI, Gusev NB: Effects of small heat shock proteins on the thermal denaturation and aggregation of F-actin. *Biochem.Biophys. Res. Commun.* 2005; 331(4):1548-1553

Pollard TD, Borisy GG: Cellular motility driven by assembly and disassembly of actinfilaments. *Cell.* 2003; 112(4):453-465

Powis G, Montfort WR: Properties and biological activities of thioredoxins.*Annu Rev PharmacolToxicol* 2001; 41:261-95

Prömpeler HJ, Randelzhofer B, Sauerbrei W, Madjar H: Überprüfung der Diagnose-Formel für Ovarialtumoren.*Ultraschall in der Medizin* 2000; 21: 563

Protani MM, Nagle CM, Webb PM: Obesity and ovarian cancer survival: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Prev Res.* 2012;

5(7):901-10

Pyrko P, Schönthal AH, Hofman FM, Chen TC, Lee AS: The unfolded protein response regulator GRP78/BiP as a novel target for increasing chemosensitivity in malignant gliomas. *Cancer.Res.* 2007; 67:9809-16

Qiu XB, Shao YM, Miao S, Wang L: The diversity of the DnaJ/Hsp40 family, the crucial partners for Hsp70 chaperones. *Cell.Mol. Life Sci.* 2006; 63:2560–2570

Raffel J, Bhattacharyya AK, Gallegos A, Cui H, Einspahr JG, Alberts DS, Powis G: Increased expression of thioredoxin-1 in human colorectal cancer is associated with decreased patient survival. *J Lab. Clin. Med.* 2003; 142:46-51

Raniga PV, Trapani GD, Tonissen KF: Cross Talk between Two Antioxidant Systems, Thioredoxin and DJ-1: Consequences for Cancer. *Oncoscience.* 2014; 1(1):95-110

Rao RV, Castro-Obregon S, Frankowski H, Schuler M, Stoka V, delRio G, Bredesen DE, Ellerby HM: Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. An Apaf-1-independent intrinsic pathway. *J. Biol. Chem.* 2002; 277:21836–21842

Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R: *Biochemie Duale Reihe.* 2. Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart. 2008; S.139, S. 380, S.476, S. 74-77

Ratner ML: Celgene backs into biotech. *In Vivo* 2001; 15:15

Raviol H, Sadlish H, Rodriguez F, Mayer MP, Bukau B: Chaperone network in the yeast cytosol: Hsp110 is revealed as an Hsp70 nucleotide exchange factor. *EMBO J.* 2006; 25: 2510–2518

Rayet B, Gelinas C: Aberrant rel/nfkb genes and activity in human cancer. *Oncogene.* 1999; 18:6938 -47.

Reddy RK, Mao C, Baumeister P, Austin RC, Kaufman RJ, Lee AS: Endoplasmic reticulum chaperone protein GRP78 protects cells from apoptosis induced by topoisomerase inhibitors: role of ATP binding site in suppression of caspase-7 activation. *J.Biol.Chem.* 2003; 278:20915–20924

Ries LAG, Eisner MP, Kosary CL, Hankey BF, Miller BA, Clegg L, Mariotto A, Feuer EJ, Edwards BK: SEER Cancer Statistics Review, 1975-2002, National Cancer Institute. Bethesda, MD (http://seer.cancer.gov/csr/1975_2002/ Stand 19.08.2013)

Riordan JR, Ling V: Genetic and biochemical characterization of multidrug resistance. *Pharmacol. Ther* 1985; 28:51–75

Risch HA, McLaughlin JR, Cole DEC, Rosen B, Bradley L, Kwan E, Jack E, Vesprini DJ, Kupferstein G, Abrahamson JLA, Fan I, Wrong B, Narod SA: Prevalence and penetrance of germline BRCA1 and BRCA2 mutations in a population series of 649 women with ovarian cancer. *Am J Hum Genet* 2001; 68: 700-710

Rizk SL, Sky-Peck HH: Comparison between concentrations of trace elements in normal and neoplastic human breast tissue. *Cancer Res.* 1984; 44:5390-4

Rudin CM, Brahmer JR, Juergens RA, Hann CL, Ettinger DS, Sebree R. et al. Phase 2 study of pemetrexed and itraconazole as second-line therapy for metastatic nonsquamous non-small-cell lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2013;8:619–23

Robert Koch Institut, Krebsdaten 2012 (Stand: 17.12.2015)

Rock KL, Gramm C, Rothstein L, Clark K, Stein R, Dick L, Hwang D, Goldberg AL: Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class 1 molecules. *Cell.* 1994; 78:761-771

Rodriguez C, Patel AV, Calle EE, Jacob EJ, Thun MJ: Estrogen replacement therapy and ovarian cancer mortality in a large prospective study of US women. *JAMA* 2001; 285:1460-5

Rogalla T, Ehrnsperger M, Preville X, Kotlyarov A, Lutsch G, Ducasse C, Paul C, Wieske M, Arrigo AP, Buchners J, Gaeste M: Regulation of Hsp27 oligomerization, chaperone function, and protective activity against oxidative stress /tumor necrosis factor alpha by phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 1999; 274:18947-18956

Rolinski M, Fox C, Maidment I, McShane R: Cholinesterase inhibitors for dementia with Lewy bodies, Parkinson's disease dementia and cognitive impairment in Parkinson's disease. *Cochrane Database Syst Rev.* 2012;

14;3

Römisch K: Endoplasmic reticulum-associated degradation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2005; 21:435-56

Ron D, Habener JF: CHOP, a novel developmentally regulated nuclear protein that dimerizes with transcription factors C/EBP and LAP and functions as a dominant-negative inhibitor of gene transcription. *Genes Dev.* 1992; 6:439-453

Ron D, Walter P: Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat.Rev.Mol. Cell.Biol.* 2007; 8:519-29

Rutkowski DT, Arnold SM, Miller CN, Wu J, Li J, Gunnison KM, Mori K, Akha AAS, Raden D, Kaufman RJ: Adaptation to ER stress is mediated by differential stabilities of pro-survival and pro-apoptotic mRNAs and proteins. *PLoS Biol.* 2006; 4:374

Ryter SW, Alam J, Choi AM: Heme oxygenase-1/carbonmonoxide: from basic science to the therapeutic applications. *Physiol.Rev.* 2006; 86: 583-650.

S3-Leitlinie, Diagnostik, Therapie und Nachsorge maligner Ovarialtumoren: Version 2.0 – Oktober 2016, AWMF - Registernummer: 032/035OL

Sánchez-Alcázar JA, Khodjakov A, Schneider E: Anticancer drugs induce increased mitochondrial cytochrome c expression that precedes cell death. *Cancer Res.* 2001; 61:1038-1044

Saris N, Makarow M: Transient ER retention as stress response: conformational repair of heat-damaged proteins to secretion-competent structures, *J. Cell Sci.* 1998; 111: 1575-1582

Sato A: The human immunodeficiency virus protease inhibitor ritonavir is potentially active against urological malignancies. *Onco Targets Ther.* 2015; 8:761–768

Schafer A, Teufel J, Ringel F, Bettstetter M, Hoepner I, Rasper M, Gempt J, Koeritzer J, Schmidt-Graf F, Meyer B, Beier CP, Schlegel J: Aldehyde dehydrogenase 1A1—a new mediator of resistance to temozolomide in

glioblastoma. *Neuro. Oncol.* 2012; 14:1452-1464

Schildkraut JM, Bastos E, Berchuck A: Relationship between life-time ovulatory cycles and overexpression of mutant p53 in epithelial ovarian cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1997; 89:932-8

Schönthal AH: Pharmacological targeting of endoplasmic reticulum stress signaling in cancer; *Biochemical Pharmacology*, 2013; 85(5): 653–666

Sen CK, Khanna S, Venojarvi M, Trikha P, Ellison EC, Hunt TK, Roy S: Copper-induced vascular endothelial growth factor expression and wound healing. *Am. J Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2002; 282(5):H1821-7

Shashidharamurthy R, Koteiche HA, Dong J, McHaourab HS: Mechanism of chaperone function in small heat shock proteins: Dissociation of the HSP27 oligomer is required for recognition and binding of destabilized T4 lysozyme. *J. Biol. Chem.* 2005; 280:5281-5289

Shen J, Chen X, Hendershot L, Prywes R: 2002. ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of golgi localization signals. *Dev. Cell.* 2002; 3:99–111

Shi C, Zhang GB, Yin SW: Effect of bortezomib on migration and invasion in cervical carcinoma HeLa cell. *Asian Pac J Trop Med.* 2015;8(6):485-8

Shim JS und Liu JO: Recent Advances in Drug Repositioning for the Discovery of New Anticancer Drugs. *Int. J. Biol. Sci.* 2014; 10(7): 654-663

Shim JS, Rao R, Beebe K, Neckers L, Han I, Nahta R. et al. Selective inhibition of HER2-positive breast cancer cells by the HIV protease inhibitor nelfinavir. *J Natl Cancer Inst.* 2012;104:1576–90

Shoshan MC, Linder S: Target specificity and off-target effects as determinants of cancer drug efficacy. *Expert Opin. Drug Metab.Toxicol.*2008; 4:273-280

Siddik ZH: Cisplatin: Mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene.* 2003; 22:7265-7279

Sjovall K, Nilsson B, Einhorn N: The significance of serum CA 125 elevation in malignant and nonmalignant diseases. *Gynecol. Oncol* 2002;

85:175

Song B, Scheuner D, Ron D, Pennathur S, Kaufman RJ: Chop deletion reduces oxidative stress, improves β -cell function, and promotes cell survival in multiple mouse models of diabetes. *J.Clin.Invest.* 2008; 118:3378-3389

Sugiyama Y, Suzuki A, Kishikawa M, Akutsu R, Hirose T,Waye MM, Tsui SK, Yoshida S, Ohno S: Muscle develops a specific form of small heat shock protein complex composed of MKBP/HSPB2 and HSPB3 during myogenic differentiation. *J. Biol. Chem.* 2000; 275:1095-1104

Suh JJ, Pettinati HM, Kampman KM, O'Brien CP: The status of disulfiram: a half of a century later. *J ClinPsychopharmacol.* 2006; 26:290-302

Sun X, Welsh MJ, Benndorf R: Conformational Changes resulting from pseudophosphorylation of mammalian small heat shock proteins – a two hybrid study. *Cell Stress Chaperons.* 2006; 11:61-70

Sun Y, MacRae TH: The small heat shock proteins and their role in human disease. *FEBS Journal.* 2005; 272(11)2613-2627

Suzuki Y, Fujii S, Tominaga T, Yoshimoto T, Yoshimura T, Kamada H: The origin of an EPR signal observed in dithiocarbamate-loaded tissues. Copper (II)-dithiocarbamate complexes account for the narrow hyperfine lines. *Biochim.Biophys. Acta* 1997; 1335: 242-245

Szegezdi E, Logue SE, Gorman AM, Samali A: Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO reports.* 2006; 7, 880-885

Tabas I, Ron D: Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nat.Cell.Biol.* 2011; 13:184–190

Takahashi R, Deveraux Q, Tamm I, Welsh K, Assa-Munt N, Salvesen GS, Reed JC: A single BIR domain of XIAP sufficient for inhibiting caspases. *J Biol. Chem.* 1998; 273:7787-7790

Telleria CM: Drug repositioning for cancer Therapy. *J Cancer Sci Ther.* 2012; 4(7):9-11

The cancer genome atlas research network: Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature*. 2011; 474:609–615

Thorp E, Li G, Seimon TA, Kuriakose G, Ron D, Tabas I: Reduced apoptosis and plaque necrosis in advanced atherosclerotic lesions of Apoe^{-/-} and Ldlr^{-/-} mice lacking CHOP. *Cell Metab*.2009; 9:474-481

Tobinick EL: The value of drug repositioning in the current pharmaceutical market.*Drug News Perspect* 2009; 22:119-25

Toh Y, Nicolson GL: The role of the MTA family and their encoded proteins in human cancers: molecular functions and clinical implications.*ClinExpMetastasis*. 2009; 26(3):215-27

Tonkin EG, Valentine HL, Milatovic DM, Valentine WM: N, N-diethylthiocarbamate produces copper accumulation, lipid peroxidation, and myelin injury in rat peripheral nerve. *Toxicol.Sci*. 2004; 81:160-171

Tsao A: Thalidomide's surprising act IV. *Business Week* 2003 (http://www.businessweek.com/technology/content/sep2003/tc20030924_0938_tc074.htm Stand: 24.09.2013)

Tummala MK, McGuire WP: Recurrent ovarian cancer. *Clinical Advances in Hematology& Oncology* 2005; 3(9), 723–736

Turecky L, Kalina P, Uhlikova E, Namerova S, Krizko J: Serum ceruloplasmin and copper levels in patients with primary brain tumors. *Klin Wochenschr*. 1984; 62(4):187-9

Ubeda M, Wang XZ, Zinszner H, Wu I, Habener JF, Ron D: Stress-induced binding of the transcriptional factor CHOP to a novel DNA control element. *Mol.Cell.Biol*.1996; 16:1479-1489

Ulianich L, Insabato L: Endoplasmic Reticulum Stress in Endometrial Cancer. *Front Med*. 2014; 1:55

Urano F, Wang X, Bertolotti A, Zhang Y, Chung P, Harding HP, Ron D: Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science*. 2000; 287:664-66619

Utler C, Osterholz T, Dose Schwarz J, Thomssen C, Jänicke F: Impact of radical cytoreductive surgery on survival of patients with advanced

ovarian cancer. Geburtsh. Frauenheilk. 2005; 65:1168-117

Vera M, Pani B, Griffiths LA, Muchardt C, Abbott C, Singer RH, Nudler E: The translation elongation factor eEF1A1 couples transcription to translation during heat shock response. eLife 2014; 3:03164

Verband Forschender Arzneimittelhersteller e.V.,
www.vfa.de/embed/statistics-2012 S. 8, Stand: 05.11.2014

Vergheese J, Abrams J, Wang Y, Morano KA: Biology of the Heat Shock Response and Protein Chaperones: Budding Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) as a Model System. Microbiol Mol Biol Rev. 2012; 76(2):115-158

Verma U, Sharma R, Gupta P, Kapoor B, Bano G, Sawhney V: New uses for old drugs: novel therapeutic options. Indian J Pharmacol. 2005; 37(5):279-287

Vigilanza P, Aquilano K, Rotilio G, Ciriolo MR: Transient cytoskeletal alterations after SOD1 depletion in neuroblastoma cells. Cell Mol Life Sci. 2008; 65: 991-1004

Vos MJ, Hageman J, Carra S, Kampinga HH: Structural and Functional Diversities between Members of the Human HSPB, HSPH, HSPA, and DNAJ Chaperone Families. Biochemistry 2008; 47:7001–7011

Vujanac M, Fenaroli A, Zimarino V: Constitutive nuclear import and stress-regulated nucleocytoplasmic shuttling of mammalian heat-shock factor 1. Traffic. 2005; 6:214-29

Walter C, Al-Nawas B, Grötz KA, Thomas C, Thüroff JW, Zinser V, Gamm H, Beck J, Wagner W: Prevalence and risk factors of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw in prostate cancer patients with advanced disease treated with zoledronate. Eur Urol. 2008; 54:1066-72

Wang CY, Cusack JCJ, Liu R, Baldwin AS Jr. Control of inducible chemoresistance: enhanced anti-tumor therapy through increased apoptosis by inhibition of NF- κ B. Nat. Med. 1999; 5:412-7

Wang CY, Mayo MW, Baldwin AS Jr: TNF- and cancer therapy- induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF- κ B. Science. 1996; 274:784 -7

Wang CY, Mayo MW, Korneluk RG, Goeddel DV, Baldwin AS Jr: NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science*. 1998; 281:1680-1683

Wang RE: Targeting heat shock proteins 70/90 and proteasome for cancer therapy. *Curr Med Chem*. 2011; 18(27):4250-64

Wang W, Mcleod HL, Cassidy J: Disulfiram-mediated inhibition of NF-KB activity enhance cytotoxicity of 5-Fluorouracil in human colorectal cancer cell lines. *Int. J. Cancer*. 2003; 104:504 -511

Wang Y, Mang M, Wang Y, Wang L, Klein R, Kong B, Zheng W: Tubal origin of ovarian endometriosis and clear cell and endometrioid carcinoma. *Am J Cancer Res*. 2015; 5(3):869-79

Wattenberg LW: Inhibition of chemical carcinogenesis. *J. Natl. Cancer Inst.* 1978; 60: 11-18

Welsh SJ, Bellamy WT, Briehl MM, Powis G: The redox protein thioredoxin-1 (trx-1) increases hypoxia-inducible factor 1 α protein expression: Trx-1 overexpression results in increased vascular endothelial growth factor production and enhanced tumor angiogenesis. *Cancer Res* 2002; 62:5089-95

Wettstein G, Bellaye PS, Micheau O, Bonniaud P: Small heat shock proteins and the cytoskeleton: an essential interplay for cell integrity. *Int J Biochem Cell Biol*. 2012; 44: 1680-1686

Whittemore AS, Harris R, Itnyre J: Characteristics relating to ovarian cancer risk: Collaborative analysis of twelve U.S. case-control studies. II. Invasive epithelial ovarian cancers in white women. Collaborative Ovarian Cancer Group. *Am J Epidemiol* 1992; 136:1184-1203.

Wickner S, Maurizi M, Gottesman S: Posttranslational quality control: folding, refolding and degradation of proteins. *Science*. 1999; 286:1888-1893

Wiggins HL, Wymant JM, Solfa F, Hiscox SE, Taylor KM, Westwell AD, Jones AT: Disulfiram-induced cytotoxicity and endo-lysosomal sequestration of zinc in breast cancer cells. *Biochem. Pharmacol*. 2014; S0006-2952(14)00728-X

Wu C: Heat shock transcription factors: Structure and regulation. *Annu Rev. Cell. Dev. Biol.* 1995; 11:441-469

Wyllie AH, Kerr JFR Currie AR. Cell death: The significance of apoptosis. In: *International Review of Cytology*. G. H. Bourne, J. F. Danielli. Academic Press, New York. 1980; 68:251-306

Xu B, Shi P, Fombon IS, Zhang Y, Huang F, Wang W, Zhou S: Disulfiram/copper complex activated JNK/c-jun pathway and sensitized cytotoxicity of doxorubicin in doxorubicin resistant leukemia HL60 cells. *Blood Cells Mol. Dis.* 2011; 47:264-9

Yamamoto Y, Gaynor RB: Therapeutic potential of inhibition of the NF- κ B pathway in the treatment of inflammation and cancer. *J Clin. Invest.* 2001; 107:135-42

Yang Y, Ikezoe T, Takeuchi T, Adachi Y, Ohtsuki Y, Takeuchi S. et al. HIV-1 protease inhibitor induces growth arrest and apoptosis of human prostate cancer LNCaP cells in vitro and in vivo in conjunction with blockade of androgen receptor STAT3 and AKT signaling. *Cancer Sci.* 2005; 96:425–33

YanJun M, Hendershot LM: The role of the unfolded protein response in tumor development: friend or foe? *Nature Reviews Cancer.* 2004; 4:966-977

Yip NC, Fombon IS, Liu P, Brown S, Kannappan V, Armesilla AL, Xu B, Cassidy J, Darling JL, Wang W: Disulfiram modulated ROS-MAPK and NF kappa B pathways and targeted breast cancer cells with cancer stem cell-like properties. *Br J Cancer.* 2011; 104:1564-1574

Yoshida H, Haze K, Yanagi H, Yura T, Mori K: Identification of the cis-acting endoplasmic reticulum stress response element responsible for transcriptional induction of mammalian glucose-regulated proteins. Involvement of basic leucine zipper transcription factors. *J. Biol. Chem.* 1998; 273:33741-33749.

7 Abkürzungsverzeichnis

ABI-Software	Application Binary Interface-Software
ADP	Adenosindiphosphat
AK	Antikörper
ALDH	Aldehyddehydrogenase
AML	Akute myeloische Leukämie
ATF6	Activating transcription factor 6
ATP	Adenosintriphosphat
AUR	Auranofin
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat
BIP	Binding immunoglobulin Protein
C-DNA	Complementary DNA
CHIP	C-terminal HSP 70 interacting protein
CHOP	C/EBP homologous protein
DAPI	4', 6-Diamidin-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DSF	Disulfiram
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EtDTC	Diethyldithiocarbamid
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
F-Aktin	filamentöses Aktin
FIGO	Federation Internationale de Gynekologie et d'Obsetrique
G-Aktin	globuläres Aktin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat
GRP78	Gastrin Releasing Peptide 78
HMOX	Hämoxygenase
HSE	Heat-Shock-Response Elements

HSF	Hitzeschockfaktor
HSP	Hitzeschockprotein
I κ B	Inhibitor of kappa B
IL 6	Interleukin 6
IRE1	Inositol requiring protein 1
JNK	C-Jun N-terminale Kinasen
MAP	mitogen activated protein
mcl1	myeloid cell leukemia 1
MTA2	metastasis associated protein
MTT	3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium Bromide
NAC	N-Acetyl-Cystein
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NF- κ B	Nuclear factor kappa B
NTP	Nukleosidtriphosphat
P	Phosphoryliert
P65/RelA	Nuclear factor NF-kappa-B 65 subunit
PARP	Poly ADP ribose polymerase
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PERK	Protein Kinase RNA-like Endoplasmic Reticulum
P-gp	Permeability-Glykoprotein
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RIPA-Puffer	Radioimmunoprecipitation-Puffer
RKI	Robert Koch Institut
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive oxygen species
rpm	Rounds per minute
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SO ³	Schwefeltrioxid
STAT 3	Signal transducer and activator of transcription 3

Taq-Polymerase

Trail

Trx

U

VEGF

WHO

Thermus aquaticus-Polymerase

TNF-related apoptosis inducing ligand

Thioredoxin

Unit

Vascular endothelial growth factor

World Health Organisation

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Arzneimittelausgaben der gesetzlichen Krankenversicherung: in den Jahren 1999 bis 2014 in Milliarden Euro in Deutschland (Arzneimittelausgaben der GKV. Statistica 2015)..... 8

Abbildung 2: Schematische Darstellung der Hitzeschockreaktion: Nach einem proteotoxischen Ereignis bildet das denaturierte Protein entweder ein zytotoxisches Aggregat oder es wird durch die Hitzeschockproteine der Zelle gebunden. Durch Phosphorylierung zerfällt HSP27 in Dimere und bindet das Substrat. HSP27 führt das entfaltete Protein dem proteasomalen Abbau oder HSP70 zu. Unphosphoryliertes HSP27 hemmt den HSF1. Das entfaltete Protein kann alternativ direkt von HSP70, durch das Cochaperon HSP40 oder durch das HSP90 gebunden werden. Reicht die Hitzeschockreaktion nicht aus, um das Protein wieder in seiner korrekt gefaltete Struktur zu überführen, wird es über CHIP dem proteasomalen Abbau zugeführt (modifiziert nach: Vos et al., 2008; Lanneau et al., 2010).. 21

Abbildung 3: Schematisch Darstellung einer möglichen Form der Aktivierung von HSF1: HSF1 wird durch die Assoziation mit Hitzeschockproteinen im inaktiven Zustand gehalten. Als nicht-phosphoryliertes Oligomer blockiert HSP27 die Aktivität des HSF1. Der HSF1 wird auch durch Assoziation mit HSP90 im inaktiven Zustand gehalten. Durch proteotoxischen Stress bindet HSP90 entfaltete Proteine und HSF1 wird frei. Durch stressbedingte Phosphorylierung kommt es zur Dissoziation von HSP27 und somit zur Aufhebung der Blockade von HSF1. Somit kann HSF1 in seine aktive trimere Form übergehen und als Trimer die DNA binden (modifiziert nach: Anckar und Sistonen, 2011; Lanneau et al., 2010). 23

Abbildung 4: Schematische Darstellung der Stressreaktion im Endoplasmatischen Retikulum: Durch die Akkumulation von fehlgefalteten Proteinen kommt es zur Dissoziation von BIP von PERK, ATF6 und IRE1 in das Lumen des ER. BIP bindet die fehlgefalteten Proteine. PERK, ATF6 und IRE1 werden aktiviert und induzieren unter anderem CHOP und JNK. Bei schwerem ER-Stress überwiegt das proapoptotische Signal von JNK und CHOP den antiapoptotischen Effekt der Chaperone (BIP) und die Apoptose wird eingeleitet. (modifiziert nach: Szegezdi et al., 2006; Ma und Hendershot, 2004; Ulianich und Insabato, 2014)..... 28

Abbildung 5: Schematische Darstellung des Thioredoxinsystems: Desoxyribonukleotide entstehen durch Reduktion der entsprechenden Ribonukleotide. Diese Reaktion wird durch die Ribonukleotid-Reduktase katalysiert. Das Enzym wird anschließend durch Thioredoxin reduziert. Thioredoxin wird dann FADH₂ abhängig durch die Thioredoxin-Reduktase regeneriert (Rassow et al. 2008; Kast et al., 2013 29

Abbildung 6: Schematische Darstellung der Zwischenschritte der Zellfraktionierung 37

Abbildung 7 : Schematische Darstellung einzelner Zwischenschritte der Immunblotanalyse 42

- Abbildung 8:** Darstellung der veränderten Zellstruktur durch den Einfluss von Disulfiram/Kupfer: Die Zellen der Linie OVCAR-3 wurden 6h mit 1µM Disulfiram/Kupfer (DSF/Cu) inkubiert..... 54
- Abbildung 9:** MTT-Test: Darstellung des Zellüberlebens und die Sensitivität der verschiedenen Ovarialkarzinomzelllinien gegenüber Disulfiram bzw. der Kombination aus Disulfiram und Kupfer. Die Zellen wurden 72h lang mit Disulfiram (DSF) in ansteigender Konzentration von 0µM-5µM als Monosubstanz behandelt oder in Kombination mit 1µM Kupferchlorid (Cu²⁺)..... 56
- Abbildung 10:** Darstellung der Hitzeschockreaktion im Western Blot: Zellen der Linie OVCAR-3 und SKOV-3 wurden für 24 h mit 1µM Disulfiram (DSF), 1µM Kupferchlorid (Cu) oder mit einer Kombination aus jeweils 1µM Disulfiram und 1µM Kupfer (DSF/Cu) behandelt. Die Zelllysate wurden mit einem Auftragspuffer versetzt. Um unter reduzierenden Bedingungen (Abbildung 10A) arbeiten zu können, wurde ein Mercaptoethanol enthaltender Puffer verwendet. Für nicht-reduzierende Bedingungen wurde ein Puffer ohne Mercaptoethanol verwendet. (Abbildung 10B). Um den Einfluss von DSF/Cu zeitabhängig beurteilen zu können, wurden die Zellen der Linie OVCAR-3 und SKOV-3 über 3, 5, 7, bzw. 9h mit 1µM DSF/Cu behandelt (Abbildung 10C). Die Zelllysate wurden dann im Western Blot analysiert. 59
- Abbildung 11:** Western Blot: Zellen der Linie OVCAR-3 und SKOV-3 wurden für 24 h mit 1µM Disulfiram (DSF), 1µM Kupferchlorid (Cu) oder mit einer Kombination aus jeweils 1µM Disulfiram und 1µM Kupfer (DSF/Cu) behandelt. Die Zelllysate wurden dann im Western Blot analysiert. Bei Ubiquitin wurde eine nicht näher spezifizierte, aber auffallende Bande im höheren Molekulargewichtsbereich zur Präsentation selektiert. 60
- Abbildung 12:** Darstellung der Hitzeschockreaktion in der PCR: Zellen der Linie OVCAR-3 und SKOV-3 wurden für 3h bzw. 6h mit der Kombination aus jeweils 1µM Disulfiram und 1µM Kupfer (DSF/Cu) behandelt..... 63
- Abbildung 13:** Darstellung der subzellulären Verteilung von Hitzeschockfaktoren: Zellen der Linien OVCAR-3 und SKOV-3 wurden für 8h mit 1µM Disulfiram/Kupfer behandelt. Durch Zellfraktionierung erfolgte eine grobe Trennung in die nukleäre (N) und zytosolische (Z) Fraktion. Die Zelllysate wurden anschließend im Western Blot analysiert. Dabei wurde GAPDH als Marker für die zytosolische Fraktion und MTA 2 für die nukleäre Fraktion verwendet. 65
- Abbildung 14:** Darstellung der subzellulären Verteilung der Hitzeschockproteine unter Immunfluoreszenz: Zellen der Linie OVCAR-3 wurden 6h mit 1µM Disulfiram/Kupfer (DSF/Cu) inkubiert. Nach der Fixierung der Zellen mit Ethanol erfolgte die Applikation von Primärantikörpern gegen HSP70, HSP27 und p65/RelA sowie von entsprechenden Sekundärantikörpern. Die Zellen wurden in der Phasenkontrast- und Immunfluoreszenzmikroskopie dargestellt. A: Die Zellen wurden in 40-facher Vergrößerung fotografiert. B: Digital vergrößerte Ausschnitte der Darstellungen der Zellen nach der Behandlung mit Disulfiram/Kupfer. 69

- Abbildung 15:** Darstellung der Aktinfilamente durch den fluoreszenten Farbstoff Phalloidin: OVCAR-3 Zellen wurden 4 bzw. 8h mit Disulfiram/Kupfer behandelt und anschließend mit Phalloidin inkubiert. 71
- Abbildung 16:** Darstellung der irreversiblen Zellschädigung durch Disulfiram/Kupfer: Zellen der Linie OVCAR-3 und SKOV-3 wurden in 24-Well-Platten angesetzt (10.000 Zellen/well). Nach 4- bzw. 8h Inkubation mit 1µM Disulfiram/Kupfer wurden die Zellen durch Trypsinisierung gelöst und in einer Konzentration von 500 Zellen/Well auf eine 6-Well-Platte übertragen. Die Zellen wurden dann zur erneuten Proliferation über 10 Tage in der Zellkultur belassen. Anschließend wurden die Zellen mit Methanol fixiert und mit der Proteinfärbung gefärbt, um die unterschiedliche Zelldichte makroskopisch darzustellen. 73
- Abbildung 17:** Grafische Darstellung der Wirksamkeit von Disulfiram/Kupfer/Auranofin: OVCAR-3 und SKOV-3 Zellen wurden 72h mit einer Kombination aus Disulfiram und Kupfer (DSF/Cu) behandelt. Es wurden Konzentrationen von jeweils 125nM, 250nM und 500nM in äquimolarem Verhältnis Disulfiram und Kupfer verwendet. Es wurde das Zellüberleben gemessen unter der alleinigen Zugabe von Disulfiram/Kupfer (Rauten) im Vergleich zu dreifachen Applikation aus Disulfiram/Kupfer und 1µM Auranofin (AUR) (Rechtecke). 74
- Abbildung 18:** Darstellung der Hitzeschockreaktion im Western Blot: Zellen der Linie OVCAR-3 wurden für 24h mit 1µM Auranofin (AUR), 250nM Disulfiram/Kupfer (DSF/Cu) bzw. mit einer Kombination aller drei Medikamente behandelt. Die Zellysate wurden dann im Western Blot analysiert. 75
- Abbildung 19:** MTT-Test: Darstellung des Zellüberlebens und der Sensitivität der Mammakarzinomzelllinien MCF-7 und MDA-MB-231 gegenüber Disulfiram/Kupfer. Die Zellen wurden 72h lang mit Disulfiram/Kupfer (D/C) in ansteigender Konzentration von 0-375 nM behandelt. 77
- Abbildung 20:** Western Blot: Zellen der Linie MCF-7 und MDA-MB-231 wurden 24h lang mit aufsteigender Konzentration Disulfiram/Kupfer (DSF/Cu) behandelt. 77
- Abbildung 21:** PCR: Zellen der Linie MCF-7 wurden 4h lang in 0,5 bzw. 1µM Disulfiram/Kupfer (DSF/Cu) inkubiert. 77
- Abbildung 22:** MTT-Test: Darstellung des Zellüberlebens und der Sensitivität der Mammakarzinomzelllinien MCF-7 und MB-231 gegenüber Auranofin. Die Zellen wurden 72h lang mit Auranofin in ansteigender Konzentration von 0,25-0,75µM Auranofin (Aur) behandelt. 78
- Abbildung 23:** Darstellung der Hitzeschockreaktion in der PCR: Zellen der Linie MCF-7 wurden 24h lang mit aufsteigender Konzentration Auranofin (AUR) behandelt. Die Zellysate wurden in der PCR analysiert. 79
- Abbildung 24:** Schematische Darstellung des Disulfiramstoffwechsels: Nach oraler Aufnahme wird Disulfiram in 2 Moleküle Diethyldithiocarbamat gespalten. Diese werden dann methyliert und durch das Cytochrom P 450 zu Diethyldithiocarbamid-Methylester-Sulfoxid verstoffwechselt. Man geht davon aus, dass Disulfiram in dieser Form mit der

Aldehyd Dehydrogenase (ALDH), dem P-Glykoprotein (P-gp), dem Glutamat Rezeptor und der Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) reagiert. Durch die Bindung von Kupfer- oder Zinkionen führt Diethyldithiocarbamid (EtDTC) zu einer intrazellulären Akkumulation dieser redoxaktiven Ionen und damit zu oxydativem Stress in der Zelle. In Kombination mit Kupferionen hemmt Disulfiram außerdem das Proteasom und verursacht so eine Akkumulation zytotoxischer Proteinaggregate. Die gleichzeitige Inhibierung des Thioredoxinsystems (Trx) durch Auranofin oder der NADPH Verbrauch führen zur weiteren Akkumulation fehlgefalteter Proteine und kann so den zytotoxischen Effekt von Disulfiram verstärken (Brüning, Kast, 2014). 82

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Überblick über bereits repositionierte Medikamente	12
Tabelle 2: Überblick über Medikamente die im Rahmen der aktuellen Forschung auf mögliche alternative Indikationen untersucht werden	12
Tabelle 3: Überblick über den Ablauf der PCR	48
Tabelle 4: Übersicht verwendete Primer	50

10 Publikation

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Papaioannou M, Mylonas I, Kast RE, Brüning A: Disulfiram/copper causes redox-related proteotoxicity and concomitant heat shock response in ovarian cancer cells that is augmented by auranofin-mediated thioredoxin inhibition. *Oncoscience*. 2013; (1):21-9

11 Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. Ioannis Mylonas für die Überlassung dieses interessanten Themas sowie die freundliche Unterstützung und Beratung.

Herzlichst möchte ich mich bei Herrn Dr. rer.nat. Ansgar Brüning für die hervorragende und kompetente Betreuung bedanken, die maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Ich bedanke mich bei Frau Petra Burger für die Durchführung der MTT-Assays.

Besonderer Dank gilt meiner Familie, die mich stets in allen Lebenslagen und allen meinen Vorhaben unterstützt hat.

12 Eidesstattliche Versicherung

Papaioannou, Margarita Maria

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema Repositionierung von Disulfiram zur Therapie des Ovarialkarzinoms selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin/Doktorand
